

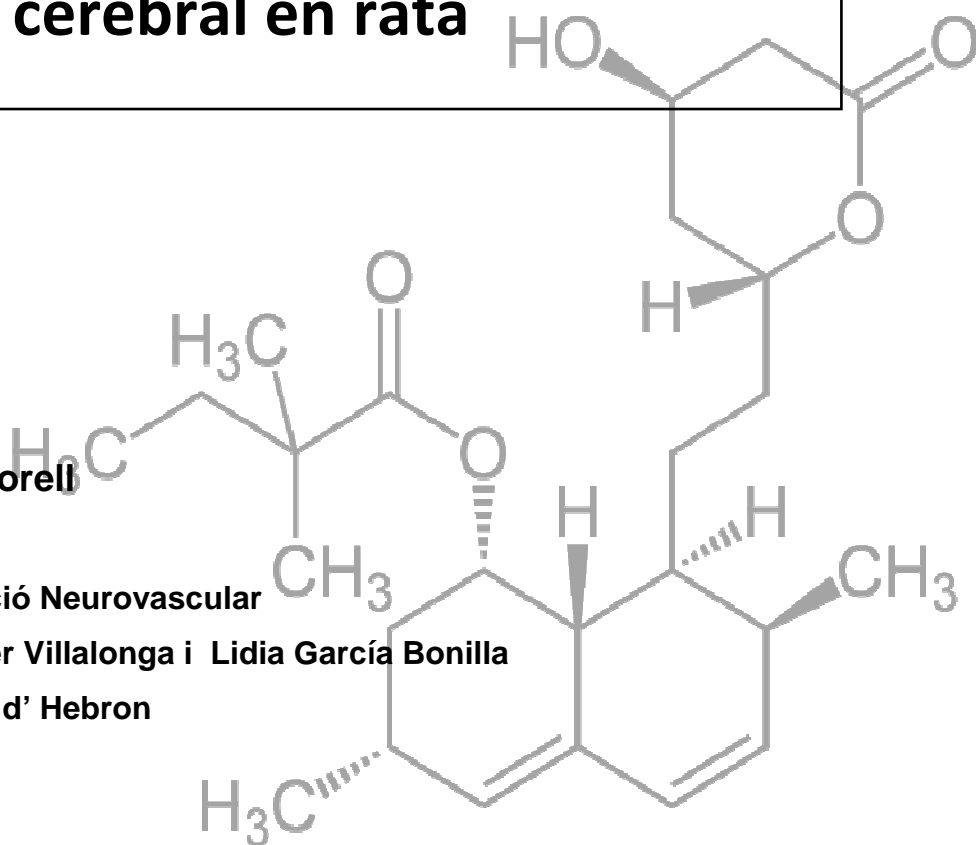
**Benefici de la SIMVASTATINA en el  
tractament trombolític combinat de  
l'ictus en models d'isquèmia  
cerebral en rata**

Mireia Campos Martorell

Laboratori d' Investigació Neurovascular

Direcció; Joan Montaner Villalonga i Lidia García Bonilla

Institut de Recerca Vall d' Hebron



**A tots aquells que, dia rere dia,  
em fan creure en la ciència**

## 1. ANEXES

### CERTIFICAT DEL DIRECTOR DEL TREBALL DE RECERCA

El **DR. JOAN MONTANER VILLALONGA**, Metge Adjunt de Neurologia de l'Hospital Universitari de la Vall d' Hebron, Coordinador del Grup de Recerca en Malalties Neurovasculars

FA CONSTAR,

que el treball titulat **BENEFICI DE LA SIMVASTATINA EN EL TRACTAMENT TROMBOLÍTIC COMBINAT DE L' ICTUS EN MODELS D'ISQUÈMIA CEREBRAL EN RATA** ha estat realitzat sota la meua direcció pel llicenciat **MIREIA CAMPOS MARTORELL**, trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball d'investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorat en Medicina Interna/Diagnòstic per la Imatge (curs 2010-2011), a la convocatòria de **setembre**.

Barcelona, 1 de setembre de dos mil onze.

## CERTIFICAT DEL CO-DIRECTOR DEL TREBALL DE RECERCA

La **DRA. LÍDIA GARCÍA BONILLA** , Investigadora Sènior del Grup de Recerca en Malalties Neurovasculars de l'Institut de Recerca de la Vall d' Hebron,

FA CONSTAR,

que el treball titulat **BENEFICI DE LA SIMVASTATINA EN EL TRACTAMENT TROMBOLÍTIC COMBINAT DE L' ICTUS EN MODELS D'ISQUÈMIA CEREBRAL EN RATA** ha estat realitzat sota la meua direcció pel llicenciat **MIREIA CAMPOS MARTORELL**, trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball d'investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorat en Medicina Interna/Diagnòstic per la Imatge (curs 2010-2011), a la convocatòria de **setembre**.

Barcelona, 1 de setembre de dos mil onze.

## ÍNDEX

1. ANEXES
2. RESUM
3. ABREVIATURES
4. INTRODUCCIÓ
  - 4.1 L' ictus
  - 4.2 L' ictus isquèmic
  - 4.3 Models animals d' isquèmia cerebral
  - 4.4 Tractament trombolític amb rt-PA
  - 4.5 Tractament amb estatines
  - 4.6 Tractament amb estatines en models experimentals d' isquèmia cerebral
5. HIPÒTESI I OBJECTIUS
6. MATERIALS I MÈTODES
  - 6.1 Animals utilitzats (rates normo i hipertenses)
  - 6.2 Tractaments administrats
  - 6.3 *Capping*
  - 6.4 Formació de coàguls
  - 6.5 MCAOe
  - 6.6 Valoració del volum d' infart (tincions histològiques i TTC)
  - 6.7 Valoració del dèficit neurològic
  - 6.8 Valoració de les infeccions (citometria de flux)
  - 6.9 Valoració de les hemorràgies (Western Blot i visual score)
  - 6.10 Estadística
7. RESULTATS
8. DISCUSSIÓ
9. CONCLUSIONS
10. REFERÈNCIES

## 2. RESUM

L' ictus és un dels reptes sanitaris més importants al nostre país ja que l'únic tractament disponible és l'administració de trombolítics durant les 4,5 primeres hores i menys d' un 10% dels pacients poden beneficiar-se'n.

Publicacions anteriors han demostrat que el tractament de l' ictus amb estatines pot reduir l'extensió del teixit infartat i millorar la funció neurològica, per això proposem fer un estudi experimental usant un model d' isquèmia en rata, que evidenciï si el tractament combinat de Simvastatina i rt-PA incrementa el benefici obtingut únicament amb fàrmacs trombolítics i avaluï la seva seguretat quan s'administra durant la fase aguda (transformacions hemorràgiques i incidència d'infeccions).

Amb aquest treball, s'ha pogut demostrar que l' administració de Simvastatina en fase aguda aporta beneficis sobre la reducció del volum d'infart i la milloria del dèficit neurològic i que no incrementa la incidència de transformacions hemorràgiques després del tractament amb el trombolític. Malgrat de manera preliminar s'ha pogut observar que no augmenta el percentatge de polimorfonuclears en sang a les 48 hores de la isquèmia, calen més estudis (actualment en procés), per poder afirmar amb seguretat que la Simvastatina administrada després de la isquèmia no contribueix a un increment en la incidència d' infeccions. De comprovar- se aquest fet, podríem assegurar que la Simvastatina administrada en la fase aguda de la isquèmia, a part d' aportar beneficis, és segura.

### 3. ABREVIATURES

- MCA: de l' anglès *Middle Cerebral Arteria*
- BHE: Barrera Hemato-encefàlica
- MCAO: de l' anglès *Middle Cerebral Arterial Occlusion*
- MMP: Metal·loproteinasa de Matriu
- rtPA: de l' anglès *recombinant Tissue Plasminogen Activator*
- SNC: Sistema Nerviós Central
- TH: Transformació hemorràgica
- HMG-CoA: Hidroxi- Metil- Glutaril- Coenzim-A
- NO: de l' anglès *Nitric Oxid*
- PCR: Proteïna C Reactiva
- WB: Western Blot
- TTC: de l' anglès *triphenyletrazolium chloride*
- OCT: de l' anglès *Optimal Cutting Temperature*
- PFA: Paraformaldehid
- IP: Hemisferi cerebral Ipsilateral o isquèmic
- CL: Hemisferi cerebral Contralateral o no isquèmic
- H&E: Tinció amb Hematoxilina i Eosina
- PMNs: Polimorfonuclears
- H<sub>2</sub>O dest.: Aigua destil·lada
- NaOH: Hidròxid Sòdic
- Simv : Simvastatina
- Veh : Vehicle
- OD: Densitat òptica (unitats de mesura per a WB)
- SSF: Sèrum Salí Fisiològic
- SSH: Sèrum Salí Heparinitzat

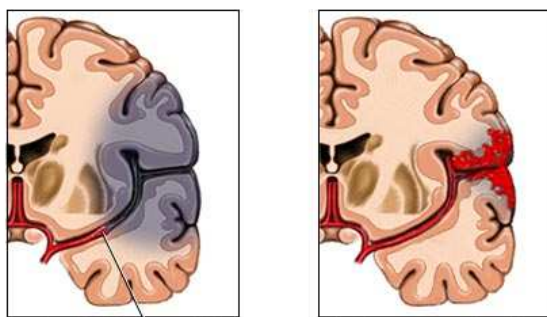
## 4. INTRODUCCIÓ

### 4.1 L'ICTUS

La patologia neurovascular aguda o **ictus** és un trastorn en una zona del parènquima encefàlic produïda per una alteració aguda en el flux dels vasos sanguinis cerebrals. Com a resultat d'aquests trastorns, apareixeran diferents dèficits neurològics (afàsia, hemiparèsia, pèrdua de consciència, pèrdua de visió, vertigen, entre d'altres) segons la zona de l'encèfal afectada. Aquests dèficits poden ser transitoris o permanents, depenent de l'evolució clínica i del tipus d'oclusió (Adams et al 1993).

L' ictus es pot classificar en dos tipus depenent de si s' ocasiona com a resultat de la ruptura d'un vas sanguini cerebral produint l'extravasació de sang a l'interior del parènquima encefàlic (*ictus hemorràgic*), o per l'obstrucció del vas que interromp el flux sanguini (*ictus isquèmic*) (Adams et al 1993).

Aquesta malaltia constitueix un dels problemes més importants del nostre sistema sanitari, ja que la incidència anual és de 150-200 casos per cada 100.000 habitants. L' ictus és en l'actualitat la primera causa de mortalitat, representant l' 11,5% del total de defuncions del nostre país i és la primera causa d'incapacitat física i invalidesa a llarg termini a causa de les seqüeles motores i sensibles que deixa (Roger et al 2011). Els principals factors de risc que s'associen a l' ictus són: hipertensió, diabetis, tabaquisme, hipercolesterolèmia, alcoholisme, sedentarisme, obesitat, i és marcadament prevalent a partir dels 65 anys (Larrue et al 1996).



**Figura 1.**  
Imatge d'un cervell mostrant l'oclusió d'una artèria cerebral (ictus isquèmic) o el trencament d'un vas amb extravasació de sang al parènquima cerebral (ictus hemorràgic).  
(Modificat de © 2008 Nucleus Medical Art, Inc.)

### 4.2 L' ICTUS ISQUÈMIC

L' **ictus isquèmic** suposa un 80% del total d' ictus que es produeixen. (**Figura 1**). És el resultat de l'oclusió d'una artèria cerebral de mitjà o gran calibre i generalment pot tenir un origen cardioembòlic o



aterotrombòtic. Els primers són originats per l'obstrucció d'una artèria cerebral per un coàgul d'origen cardíac, mentre que els segons es produeixen per la formació de trombus locals en algunes artèries amb estenosi ateroscleròtiques (Adams et al 1993).

Com a conseqüència de la interrupció del flux sanguini es produeix una lesió tissular anomenada *core de l'infart*, amb abundància de cèl·lules mortes per necrosi. Si durant les primeres hores no es produeix la recanalització espontània de l'artèria, s'ha de procedir a intentar lliar el coàgul per tractar d'evitar el creixement de l'infart a zones perifèriques també hipoperfoses i metabòlicament afectades però encara salvables (*penombra isquèmica*), que poden quedar incloses dins l'àrea infartada (Obrenovitch et al ; 1995, Sharp et al 2000).

Amb l'obstrucció de l'artèria i a causa de la privació de nutrients i oxigen, i per tant, de pèrdua energètica, s'inicia la cascada isquèmica que, des del primer moment, comporta canvis metabòlics a nivell cel·lular i tissular que s'allarguen en els dies posteriors amb un curs característic. La manca d'oxigen i glucosa al cervell fa que caiguin els nivells d' ATP i això provoca la despolarització de membrana amb la consegüent alliberació de neurotransmissors com el glutamat, que produeix l'edema excitotòxic, estrès oxidatiu per la formació de gran quantitat de radicals lliures, lesions a l'endoteli vascular que comporten alteracions en la barrera hematoencefàlica (BHE) i formació d'edema vasogènic secundari (Nishizawa et al; 2001).

En les primeres hores després de la isquèmia es produeix també la resposta inflamatòria. Aquesta s'allarga durant els dies següents i provoca efectes adversos com dany tissular, mort neuronal i pèrdua d'integritat vascular (Chamorro et al; 2004 , Zheng et al; 2004). En la resposta inflamatòria local, la microglia contribueix a l'alliberament de citosines i quimosines que influencien en l'expressió de molècules d'adhesió en les cèl·lules endotelials (Frijns et al; 2002). Aquests canvis vasculars comporten el reclutament de leucòcits, la seva adhesió i migració a través de l'endoteli amb la consegüent augment de permeabilitat de BHE. La infiltració d'aquestes cèl·lules inflamatòries juntament amb les cèl·lules del sistema nerviós produeixen també l'activació d'alguns sistemes de proteòlisi i remodelat de la matriu extracel·lular. Entre aquests es troben les metal·loproteïnases de matriu (MMP), que amplifiquen el dany tissular i contribueixen a processos de mort neuronal (Akopov et al; 1996, Fukuda et al; 2004).

#### **4.3 MODELS ANIMALS D' ISQUÈMIA CEREBRAL**

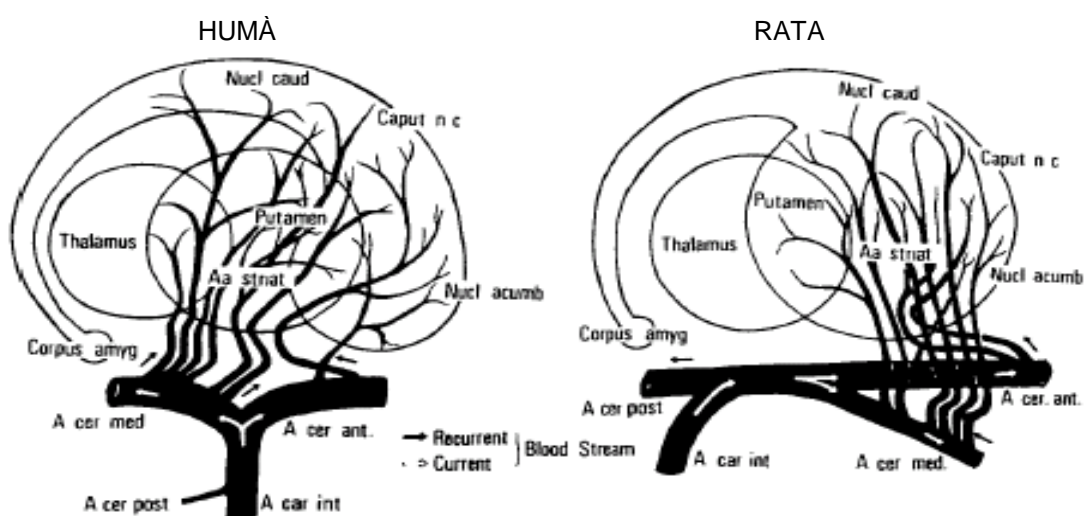
L' estudi a través de l'ús de models animals pretén reproduir de la manera més estricta possible els fenòmens biològics implicats en la malaltia d' estudi (**Figura 2**). Per a l'estudi sistemàtic de la fisiopatologia i tractament de la isquèmia cerebral és imprescindible l' ús de models *in vivo* ja que:

- La isquèmia cerebral humana és molt variada en les seves manifestacions i causes i aquesta diversitat només pot abordar-se des dels models experimentals, on el control d'aquestes variables és possible.

- Per a l' estudi histopatològic, bioquímic i fisiològic que requereixen tècniques invasives i l' accés directe al teixit cerebral.
- Per a l'estudi dels primers moments de dany isquèmic o del moment de la reperfusió del teixit isquèmic.
- Per a l' avaluació de l' efecte d' un determinat fàrmac sobre el dèficit neurològic o per a veure l' efecte d' aquest fàrmac sobre la resta de teixits de l' organisme no implicats directament amb la isquèmia cerebral.

Existeixen dos tipus bàsics de models experimentals en funció del tipus d' isquèmia cerebral que es vulgui estudiar: global i focal. La isquèmia global reproduïx la lesió cerebral d' una parada cardíaca que pugui succeir en l' ésser humà. Els models d' isquèmia focal es centren en l' oclusió de l' artèria cerebral mitja (MCA) i es poden classificar en models transitoris o permanents depenent de si es permet o no la reperfusió del teixit isquèmic. Per al nostre estudi, realitzarem un model d' isquèmia focal, ja que ens permet reproduir el tipus d' oclusió més freqüent en clínica humana i serà el nostre objecte d' estudi: l' oclusió vascular trombòtica.

En la isquèmia focal, l' obstrucció del vas ocasiona un gradient de danys a la zona implicada, amb una isquèmia intensa al centre del territori vascular o "nucli isquèmic" i una isquèmia menys pronunciada a la perifèria del mateix. D' aquesta manera, l' ictus isquèmic produeix una lesió bàsicament necròtica que afecta el nucli isquèmic i que configura la zona de l' infart. Aquesta lesió s' acompanya, a més, d' una extensa inflamació amb edema i gliosi. La zona que rep una aportació sanguínia subministrada pels vasos propers que no han patit oclusió, es denomina, com hem comentat anteriorment, "zona de penombra isquèmica" i els símptomes neurològics que apareixen poden ser reversibles. La importància de la zona de penombra isquèmica rau en què les cèl·lules que han sobreviscut a la isquèmia, es poden recuperar quan es restableix el flux sanguini i milloren les condicions hemodinàmiques.



**Figura 2.** *Stroke* (1976) 7;46-53

Imatge on s' aprecia la similitud de la vasculatura cerebral entre l' humà i la rata.

#### 4.4 TRACTAMENT TROMBOLÍTIC AMB rtPA

Actualment l' administració de l'activador tissular del plasminogen recombinant (rtPA) és l' única opció terapèutica aprovada per la FDA en la fase aguda de l' ictus isquèmic. Amb aquest fàrmac s' intenta lliurar el trombus i reperfondre la zona infartada per tractar d'evitar que l' infart establert inicialment creixi i recluti parènquima de penombra (NINDS; 1995).

El fibrinolític administrat, rtPA, és una serin-proteasa d'un pes molecular aproximat de 70kDa. El seu paper clàssic en la cascada fibrinolítica respon a la catàlisi específica del plasminogen a plasmina. Aquesta activació es dona mitjançant el tall del plasminogen per l'enllaç peptídic Arg560-Val561, resultant en la formació de la plasmina, de dues cadenes peptídiques unides per un pont disulfur. La plasmina en sang, actua degradant els clots de fibrina (Vassalli et al; 1991).

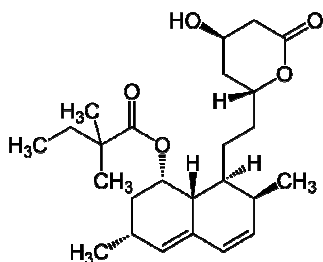
A més d'expressar-se en sang on exerceix les seves accions en la cascada fibrinolítica, el tPA endogen també s'expressa al sistema nerviós central (SNC). Diferents poblacions cel·lulars com la glia i les neurones expressen i sintetitzen tPA, així com també ho fa la microglia activada (Krystosek et al., 1988, Rogove et al; 1999). Al parènquima cerebral exerceix diferents funcions, sent clau en el manteniment de la homeòstasi i la funcionalitat de les neurones (Sappino et al; 1993 , Davies et al; 1998).

La principal limitació de l'ús del rtPA com a teràpia trombolítica és l'estreta finestra terapèutica, limitada inicialment a les 4.5 primeres hores des de l' inici dels símptomes (Hacke et al; 2008). Això és degut als efectes adversos que pot ocasionar l' rtPA si s'administra més tardanament. Algunes complicacions són el dany neuronal (Wang et al; 1998 ) o la transformació hemorràgica (TH), que afecta un 5-10% dels malalts tractats i que comporten una alta taxa de mortalitat (Sloan et al; 1987).

La transformació hemorràgica és un fenomen multifactorial en el qual el teixit cerebral isquèmic pateix la ruptura del vas i es converteix en una lesió hemorràgica (Rosell et al; 2008). La infiltració al cervell de neutròfils provinents de sang perifèrica compromet la integritat de la BHE, augmentant el risc de TH. Això pot contribuir de forma addicional al dany cerebral després de l' ictus, sent les hemorràgies induïdes pel tractament trombolític especialment perilloses (Montaner et al; 2003, Rosell et al; 2008).

#### 4.5 TRACTAMENT AMB ESTATINES

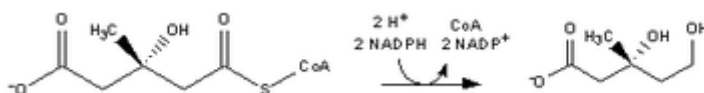
La família de les estatines engloba una gran varietat de fàrmacs. Es poden classificar en naturals (Lovastatina, Paravastatina i Simvastatina) i sintètiques (Atorvastatina , Rosuvastatina i Fluvastatina) o també segons si són lipofíliques (Atorvastatina, Lovastatina, Simvastatina i Fluvastatina), que poden travessar la BHE o hidrofíliques (Paravastatina i Rosuvastatina) (Vaughan et al; 2004) Nosaltres estudiarem la Simvastatina (**Figura 3**), natural i lipofílica obtinguda a partir d' un producte de fermentació de l' *Aspergillus terreus*.



**Figura 3.**  
Estructura química de la Simvastatina

Tot i que les estatines continuen essent usades en clínica bàsicament per a disminuir el colesterol en pacients hipercolesterolèmics, ja fa uns anys que s'investiga el paper que poden exercir sobre les patologies cardiovasculars, independentment dels seus efectes hipolipemiants.

Des del punt de vista farmacològic, les estatines s'enquadren dins els inhibidors de l' hidroximetilglutaril-coenzim-A reductasa (HMG-CoA). Aquest enzim catalitza la conversió d' HMG-CoA a mevalonat, que és un metabòlit clau en la biosíntesi del colesterol (**Figura 4**). Aquest bloqueig es produeix gràcies a la gran semblança estructural entre aquests fàrmacs i l' HMG-CoA (Endo et al; 1976)



**Figura 4.**

Reacció química induïda per les estatines, on una mol·lècula d' HMG-CoA es redueix mitjançant l' actuació de la HMG-CoA reductasa i el coenzim NADPH, donant com a resultat mevalonat i CoA (Rodwell et al; 1976)

Es pot dir, doncs, que les conseqüències de la inhibició de la HMG-CoA es divideixen en 2 subgrups (Wang et al; 2010):

1. Derivades de la interacció sobre el metabolisme del colesterol

- Disminució dels nivells de colesterol total i LDL
- Disminució de la densitat de partícules LDL
- Disminució dels nivells d' apolipoproteïna B
- Augment moderat de cHDL i reducció dels triglicèrids plasmàtics.

2. Efectes pleiotròpics: beneficis addicionals no atribuïbles a la reducció de cLDL. (**Figura 5**)

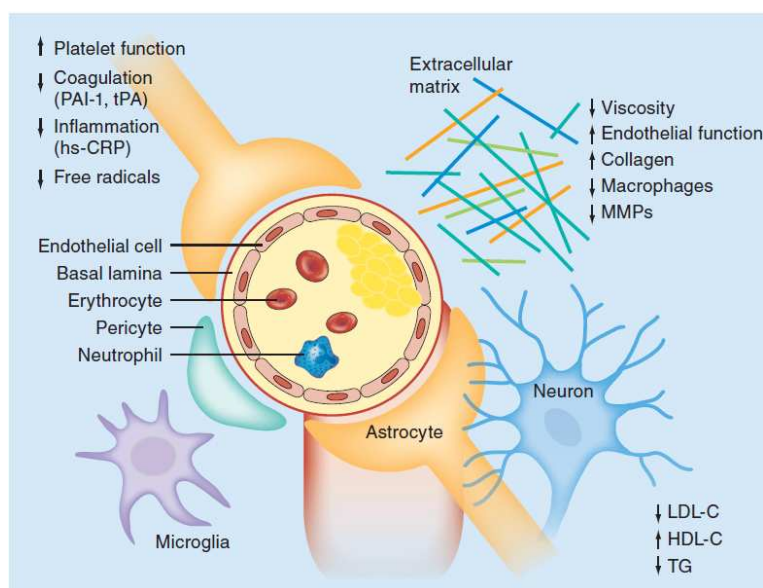
- Alteració en la formació d' isoprenoids a partir del mevalonat( Goldstein et al; 1990) Els isoprenoids (farnesilpirofosfat i geranilgeranilpirofosfat) són mol·lècules necessàries per a la modificació postraducciona d'una gran varietat de proteïnes, i com a conseqüència de l' alteració en la seva formació, es redueix la prenilació de les proteïnes G (Rho, Rac, Racl, Rab i Ras) implicades en la regulació de la pressió arterial i la contracció de la musculatura vascular.
- Propietats antiateroescleròtiques i antitrombòtiques (inhibició de l' activació plaquetària i de la secreció de Proteïna C Reactiva (PCR)) (Hale et al; 1998, Huhle et al; 1999)
- Propietats sobre la funció endotelial. Les estatines augmenten la biodisponibilitat de l' Òxid Nítric (NO) (Laufs et al; 1998, Kureishi et al; 2000), mol·lècula essencial per a l' adequada funció i

vasodilatació de l' endotel·li ja que és la responsable de la inhibició de mecanismes proinflamatoris i dels efectes antioxidants sobre les lipoproteïnes. En protegir l' NO, les estatines disminueixen l' agregació plaquetària i la reducció del tromboxà A2 per part de les plaquetes limitant així, la formació de la placa inestable. Les estatines augmenten, a més, l'expressió del tPA ( Essig et al; 1998) i inhibeixen l'expressió d' endotl·lina-1, un potent vasoconstrictor (Hernandez-Perera et al; 1998).

- Propietats antioxidants. La pròpia acció hipolipomiant redueix l' estrès oxidatiu però a més, les estatines tenen mecanismes antioxidants propis que inhibeixen la producció del radical anió superòxid (Rikitake et al; 2001)
- Acció antiinflamatòria. Les estatines inhibeixen diverses citokines proinflamatòries i també la (PCR), considerada un marcador d'inflamació i també un factor pronòstic de risc de malaltia cardiovascular (Ridker et al; 2001)
- Supressió de l' expressió i activació de la MMP9 (Aikawa et al; 2001). En la isquèmia cerebral, les MMPs 2 i 9 s' han relacionat amb la degradació de la làmina basal, la resposta neuroinflamatòria, la mort cel·lular, l' edema vasogènic i amb complicacions hemorràgiques.

A mode de resum, doncs, podríem dir que les estatines podrien tenir efectes sobre el dany isquèmic a través de diversos mecanismes (Vaughan et al; 1996):

1. Millorant la funció endotelial
2. Modulant la resposta inflamatòria i immunitària
3. Estabilitzant la placa d'ateroma
4. Prevenint la formació del trombus.
5. Promovent l' angiògenes
6. Disminuint l' estrès oxidatiu



**Figura 5.**  
Esquema on es representen els efectes pleiotròpics de les estatines  
*Expert Review of cardiovascular Therapy.* Oct. 2009, Vol. 7, No. 10, Pàg 1219-1230

Cal destacar que diversos estudis observacionals han pogut demostrar que els pacients que prenen estatines abans de patir un ictus tenien una millor evolució neurològica durant la fase aguda del mateix (Jonsson; 2001, Martí-Fàbregas; 2004). Aquestes dades ven desembocar en el disseny i posada a punt per part de la Unitat Neurovascular de l' Hospital de la Vall d' Hebron d' un assaig clínic pilot amb Simvastatina (estudi MISTICS) com a tractament de fase aguda de l' ictus. Aquest estudi pilot va ser el primer en administrar la Simvastatina en fase aguda i va demostrar un sorprenent benefici clínic sobre els pacients, amb millores significatives a favor de la Simvastatina ja el tercer dia des de l' inici del tractament respecte dels que rebien placebo (46.4% vs 17.9%,  $p=0.022$ ) (Montaner; 2007). El benefici produït per les estatines es va poder observar també en la puntuació de la NIHSS (escala de puntuació neurològica) on en el grup de Simvastatina una major proporció de pacients va presentar millories el dia 90 (descens de més de 8 punts en la NIHSS o recuperació total: 15 vs 4 pacients,  $p=0.011$ ). Només va sorprendre que en el grup de Simvastatina existia una tendència a presentar una major proporció d' infeccions (OR= 2.4, 1.06-5.4). A partir d' aquests resultats, i per tal de poder-los generalitzar, es decidí que s'havien de reproduir en una població de major mida i que s' havia de valorar la interacció i possibles efectes sinèrgics de la Simvastatina amb l' únic tractament en fase aguda de l' ictus (t-PA). El primer punt es decidí abordar-lo amb un segon assaig clínic (STARS, actualment en procés: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01073007>) i el segon, amb l'ús d'un model d' isquèmia cerebral en rates (objectiu del present treball).

#### **4.6 Tractament amb estatines en models experimentals d' isquèmia cerebral**

Tal i com s'explicarà posteriorment en els resultats del metanàlisi, l' eficàcia de les estatines ha quedat ben demostrada des de fa anys tant a nivell experimental (AminHanjani et al; 2001) com en clínica humana (Jonsson et al; 2001) . Des de llavors, s'han dut a terme múltiples investigacions per a poder entendre el mecanisme d' acció d' aquest medicament. Wang et al, per exemple, mostraren el 2006 que la Simvastatina suprimia l' expressió i l' activació de la MMP-9 , atribuint la inactivació de l' enzim al bloqueig directe de la ruta Rho/ROCK després del tractament amb Simvastatina. Tenint en compte que l' activitat de la MMP-9 es relaciona amb l' extensió de l' infart cerebral i la presència de complicacions hemorràgiques en pacients tractats amb l' rt-PA, l'administració combinada amb Simvastatina i el bloqueig o disminució de l' activitat de la MMP-9, constituïria una estratègia terapèutica important en el tractament trombolític de l' ictus (Montaner; 2005).

A nivell experimental, i tal com s'explica a l'apartat de resultats del metanàlisi, s'han publicat molts estudis on s'usaven les principals estatines administrades a diferents dosis i vies d'administració així com en diferents moments respecte l' episodi isquèmic (abans o després de la isquèmia). La majoria de publicacions fan referència a un tractament pre-isquèmia, per exemple, Endres et al; 2004 i Asahi et al; 2005 demostraren que els beneficis obtinguts amb el tractament a base d' estatines eren deguts a la seva capacitat per incrementar els nivells de eNOS i de tPA endogen. Altres treballs (Lapchak et al; 2009) comprovaren que l' administració d' estatines era capaç de disminuir la

incidència d'aparició de transformacions hemorràgiques després de l' administració de tPA. Per a la realització d' aquests treballs, s'han usat diferents models animals per tal d' induir la isquèmia cerebral (model del filament o embòlic, model transitori o permanent). Tenint en compte totes les variables estudiades, el resultat global és que l' ús d' estatines desemboca en una millor evolució neurològica dels animals i en una reducció del volum d' infart.

En cap de tots aquests treballs, per això, s' ha estudiat l' eficàcia de la Simvastatina si s'administra únicament durant la fase aguda de la isquèmia i conjuntament amb l' rt-PA (únic tractament aprovat en l' actualitat) tot usant el model més semblant a la clínica humana (MCAO embòlic). Aquest va ser, doncs, l' objectiu del present treball.

## 5. HIPÒTESI I OBJECTIUS

L' objectiu principal d' aquest treball és estudiar quin paper poden exercir les estatines si s' administren durant la fase aguda de la isquèmia cerebral. Tenint en compte l' escenari actual, és evident la necessitat de trobar un tractament que, administrat juntament amb l' rt-PA durant la fase aguda de l' ictus, pugui aportar beneficis, sobretot a nivell de recuperació neurològica. Coneixent els efectes pleiotròpics de les estatines (Vaughan et al; 1996) i l' ús de les mateixes com a tractament per a la prevenció secundària de l' ictus (Paciaroni et al; 2007), calia estudiar si l' administració de les mateixes, just després que es produeixi l' episodi isquèmic, podia aportar els mateixos beneficis que quan són administrades prèviament a la isquèmia. De ser així, aquest tractament, de ràpida administració, amb pocs efectes secundaris i disponible fora de l' hospital, podria arribar a un gran nombre de pacients i contribuir a la disminució de les importants seqüeles que cada any deixa aquesta patologia.

Amb tot això, els objectius concrets del nostre treball van ser:

1. Realitzar una recerca bibliogràfica i un posterior metanàlisi per a avaluar l' efecte de les estatines en models animals d' isquèmia cerebral
2. Comprovar l' eficàcia del tractament amb Simvastatina en fase aguda en un model d' isquèmia cerebral en rates normotenses.
3. Avaluar la **seguretat** de la Simvastatina administrada conjuntament amb l' rt-PA durant la fase aguda.
  - a. Comprovar que l'administració de Simvastatina en rates hipertenses no augmenta la incidència de transformacions hemorràgiques després de l'administració de l' rt-PA
  - b. Valorar quin efecte exerceix la Simvastatina administrada en fase aguda, sobre el risc d' infeccions a nivell respiratori per poder contrastar els resultats obtinguts en l' estudi clínic previ (MISTICS)

## 6. MATERIALS I MÈTODES

### 6.1 ANIMALS UTILITZATS

Per a dur a terme els diferents subprojectes englobats en aquesta tesina s'han utilitzat rates de sexe masculí. Tenint en compte que el nivell d' estrògens està sent objecte d' estudi com a factor protector per a la incidència o l' evolució de la isquèmia cerebral, l' ús de femelles hauria suposat l' adició d'una nova variable (segons en quina fase del cicle ovulatori es trobessin). S' inclogueren animals d' entre 250-300 g de dues soques:

- Wistar (Control normotenses), de la casa comercial Charles River
- SHR (de l' anglès Spontaneous Hypertensive Rats), dels laboratoris Harlan. Aquesta soca es va desenvolupar fa més de 30 anys a partir de rates Wistar Kyoto. Es comprovà que sotmetent aquestes rates a estrès crònic, desenvolupaven hipertensió espontàniament entre les 7 i les 15 setmanes d' edat. Així doncs, aquestes rates presenten un increment en la resistència vascular perifèrica que provoca una alteració en la regulació central de la pressió sanguínia. Tenint en compte que la hipertensió és un dels factors de risc per a l' aparició de transformacions hemorràgiques després de l' ictus, vam creure interessant usar una soca on l' aparició d' hemorràgies fos freqüent i que ens permetés veure l' efecte de l'administració dels diferents tractaments sobre la incidència d'aquestes hemorràgies.

### 6.2 TRACTAMENTS ADMINISTRATS

**Simvastatina/ Vehicle Simvastatina:** s'administrà una sola dosi per via subcutània 15 minuts després de l' oclusió.

Simvastatina (Uriach): S' administrà una dosi de 20 mg/Kg resuspesa en 1 mL de vehicle

Vehicle Simvastatina: Cada mL de vehicle va ser elaborat amb H<sub>2</sub>O dest (75%), etanol absolut (10%) i NaOH 0.1 M (15%)

**rt-PA/ vehicle rt-PA :** S' administrà una sola dosi per via intravenosa (vena caudal) a una velocitat de 75 µL/min 3 hores després de l' oclusió.

rt-PA (Actilyse, Boehringer): S' administrà a una dosi de 9 mg/Kg (9 vegades superior a la dosi usada en humans degut a la poca sensibilitat de la rata a aquest fàrmac). Per a preparar-lo, es reconstituí la pols amb el reconstituent a una concentració de 2mg/mL.

Vehicle rt-PA: Es va utilitzar el reconstituent del fàrmac i per a cada alíquota s'hi afegí L-arginina (0.4M) i Tween 80 (0.24%) .



### 6.3 CAPPING

El capping és una cirurgia que consisteix en la trepanació del crani en unes coordenades concretes per tal de poder introduir, posteriorment, una sonda làser que permetrà mesurar el flux cerebral sanguini de la zona irrigada per la MCA per assegurar-nos que l'oclusió s'ha realitzat correctament i que tots els animals inclosos en el projecte han patit una isquèmia d'intensitat semblant.

Els animals van ser sotmesos al capping entre 24 i 48 hores abans de la isquèmia cerebral. Anestesiats prèviament amb Isoflorà i O<sub>2</sub>, es van col·locar en una taula estereotàxica on van ser immobilitzats per les orelles i els incisius. Mitjançant una broca d'1 mm de diàmetre, es realitzà una trepanació a 2 mm del bregma (direcció caudal) i a 3 mm cap a la dreta. Una vegada realitzada la perforació, s'introduí un tub PE-50 (0.5mm de diàmetre intern) d'1 cm de longitud aproximadament i es procedí a la fixació del mateix amb cola superglue i ciment dental.



**Figura 6 .**  
Animal anestesiats durant la realització del *capping*

### 6.4 FORMACIÓ DE COÀGULS

Els coàguls que posteriorment s'introduïen fins a la part més distal de l'artèria cerebral mitja (MCA) induint la isquèmia als animals van ser formats a partir de sang arterial (extreta de l'artèria femoral) d'una rata donant. Es realitzaren dos protocols diferents segons la soca utilitzada:

#### - Rates normotenses (Wistar)

Es realitzà l'extracció de sang i es procedí a fer una barreja de sang (150 µL) i trombina reconstituïda (10 µL a concentració 0.1 UI/ µL). La barreja s'introduí en un catèter de polietilè de 0.5 mm de diàmetre amb l'ajuda d'una xeringa. Es va mantenir el tub dins un incubador a 37°C durant 2 hores i després es deixà a temperatura ambient fins poc abans de la cirurgia, quan la sang ja coagulada s'extragué i es netejà amb l'ajuda d'una xeringa amb abundant sèrum salí fisiològic (SSF). Per a induir la isquèmia es van utilitzar 2 coàguls d'1,5 cm per a cada rata.

#### - Rates hipertenses (SHR)

Es realitzà l'extracció de sang i s'introduí en un catèter de polietilè de 0.5 mm de diàmetre amb l'ajuda d'una xeringa. Es va mantenir el tub a temperatura ambient durant 2 hores i després es deixà a 4°C fins poc abans de la cirurgia, quan s'extragueren els coàguls i es netejaren amb abundant SSF.

Per a induir la isquèmia es va utilitzar 1 sol coàgul de 3 cm per a cada rata. El fet de canviar el protocol per a treballar amb les rates hipertenses es justifica més endavant, on s' explica la posada a punt del model i la necessitat de canviar el protocol degut a l' elevada mortalitat amb què ens trobàrem.

## 6.5 MCAOe

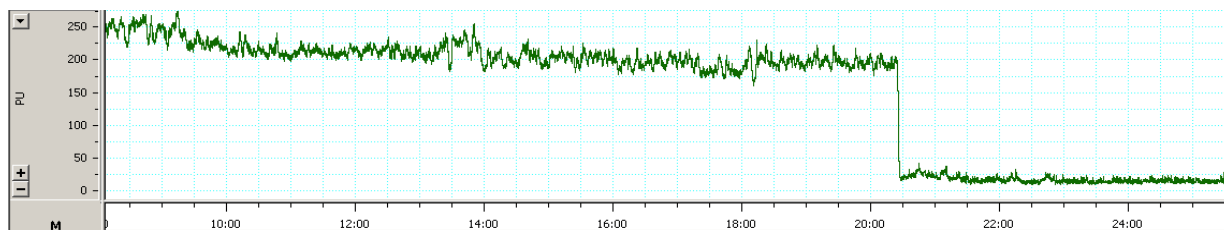
(Aquest model animal, així com tots els experiments realitzats durant aquest estudi amb animals, va ser aprovat pel Comitè Ètic de l' Institut de recerca de la Vall d' Hebron amb número de Registre: 02/09)

Prèvia anestèsia amb Isoflorà (2%), es realitzà una dissecció medial a nivell del coll i s'exposà la bifurcació carotídia dreta separant les glàndules submaxilars i els músculs omohioideu i esternohioideu. Les artèries caròtida comú (ACC) i caròtida externa (ACE) van ser dissecades i posteriorment es van termocoagular les dues primeres branques de l' ACE. Per sobre d'aquestes dues ramificacions es col·locaren dues lligadures i es seccionà l' ACE deixant un monyó. A continuació es dissecà l' artèria caròtida interna (ACI) fins veure l' artèria pterigopalatina. Aquesta última va ser lligada per la seva part més distal.

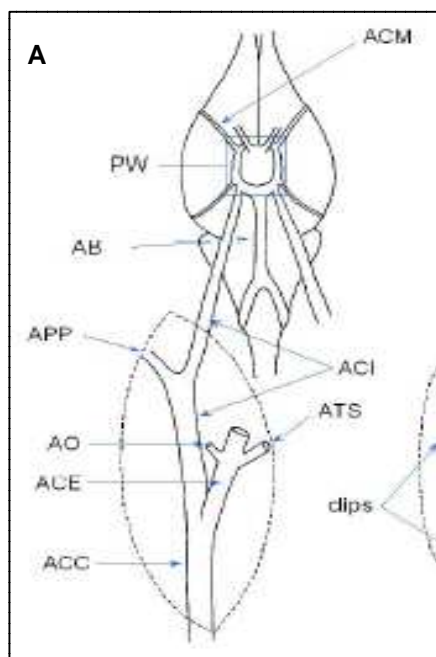
Arribats a aquest punt, es col·locaren dos clips microvasculars (un sobre l' ACC i l'altre sobre l' ACI) per tal de poder interrompre el flux sanguini cerebral momentàniament i poder introduir el coàgul exogen. Es realitzà una petita incisió a l'extrem distal del monyó i s' introduí el coàgul preparat prèviament i mitjançant una xeringa. L' oclusió de la MCA es produeix quan el coàgul sanguini introduït arriba fins a la part més distal de l'artèria, al polígon de Willis. La realització correcta del procés es comprovà amb l' observació del descens brusc de la perfusió cerebrocortical registrada amb la sonda làser- Doppler.



**Figura 7 .**  
Monitorització del fluxe cerebral. A: sonda làser. B: Monitor on es connecta el làser. C: gràfica registrada a l' ordinador on es connecta el monitor.



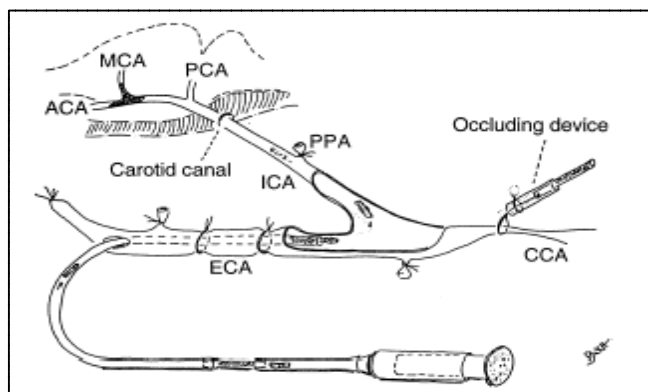
**Figura 8 .**  
Gràfica del flux sanguini vascular mostrant una correcta oclusió en introduir el coàgul sanguini.



**Figura 9.** Busch et al. *Brain Research* (1997)

A: esquema de la vasculatura cerebral d'una rata  
B: esquema mostrant el recorregut que farà el coàgul abans de d' induir l' oclusió de la MCA

**B**



## 6.6 VALORACIÓ DEL VOLUM D' INFART

La lesió induïda per la isquèmia és un paràmetre fonamental per a valorar. Es van usar dues tècniques diferents per als diferents subestudis realitzats:

### Tinció amb TTC

Una vegada extret el cervell, es realitzaren seccions coronals del mateix de 2mm de gruix amb l' ajuda d' una guillotina. Les seccions cerebrals es van submergir en TTC (triphenyletrazolium chloride) al 2.5% durant 15 minuts a temperatura ambient. Després de la tinció es podien diferenciar clarament zones pàl·lides que corresponien amb el parènquima afectat per una disfunció mitocondrial i dany cel·lular irreversible, i zones tenyides que corresponien amb el teixit sa.



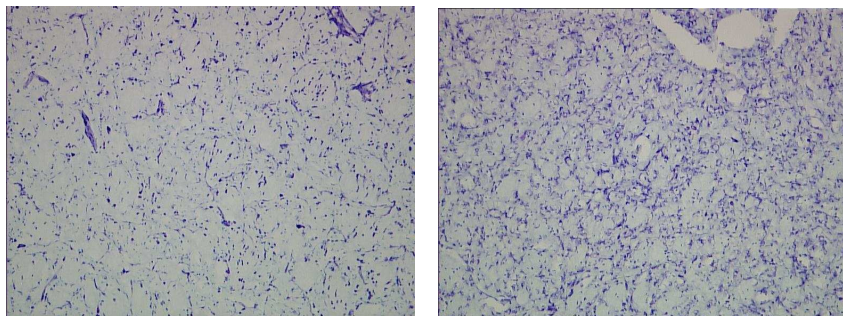
**Figura 10.**  
Seccions coronals de cervell (2mm) tenyides amb TTC

#### Tinció amb Tionina

Sota anestèsia general, els animals van ser perfosos primerament amb SS heparinitzat (SSH) i després amb SSF per tal d'eliminar tota la sang de dins els vasos. Una vegada extret el cervell se submergí en PFA al 4% durant 24 hores i posteriorment en sacarosa al 30 % 24 hores més per tal de crioprotegir el teixit. Transcorregudes les 48 hores, el cervell es va incloure en OCT i es conservà a -80°C fins a ser tallat al criòstat en seccions de 12 µm de gruix. Posteriorment, es realitzà la tinció amb Tionina, que permetia veure la zona isquèmica amb una major pal·lidesa que el teixit sa i, a més augments, permetia observar el dany neuronal.



**Figura 11.**  
Seccions de cervell (12 µ)  
tenyides amb Tionina



**Figura 12.**  
Microscopia (10x) on es  
mostra el dany neurològic.  
A: hemisferi IP  
B: hemisferi CL

En ambdues tècniques, el volum d'infart va ser calculat amb l'ajuda d' un programa informàtic (SCN Image) on, a partir de les seccions escanejades, s' obtingué el percentatge de cervell infartat mitjançant la integració d' àrees. Per arribar a obtenir aquest valor, es va multiplicar el volum de l'hemisferi CL pel volum de l' infart i es va dividir aquest valor entre el volum de l' hemisferi IL. D' aquesta manera, es va corregir el volum de l' infart calculat per l' edema ocasionat per la pròpia isquèmia.

## 6.7 VALORACIÓ DEL DÈFICIT NEUROLÒGIC

Les conseqüències neurològiques de la inducció de la isquèmia cerebral van ser avaluades mitjançant una escala neurològica : Test de Bederson modificat (on 0 suposa animal normal i 9 la màxima puntuació per a un animal infartat)

En el nostre estudi era especialment important valorar la situació neurològica per a valorar l' efecte del tractament. Per això es realitzà el test als 90 minuts de la isquèmia i just abans del sacrifici (a les 24 hores en rates hipertenses i a les 24 i 48hores en rates normotenses).

<b>Desplaçament- exploració</b>	Normal	0
	Desplaçament sense exploració	1
	Desplaçament només en estimular o no es desplaça gens	2
<b>Deriva a l' esquerra</b>	Mai	0
	En elevar la cua	1
	Esponàniament	2
	Baldufa (gir sense desplaçament)	3
<b>Subjecció de l'extremitat anterior esquerra</b>	No ho permet	0
	Ho permet però amb resistència	1
	No oposa resistència	2
<b>Reflex de paracaigudes</b>	Simètric	0
	Asimètric	1
	Pota anterior esquerra retreta cap al cos	2

**Figura 13.**  
Escala modificada de Bederson (Perez-Asensio et al, 2005)

## 6.8 VALORACIÓ DE LES INFECCIONS

### Citometria de Flux

Just abans de la perfusió, es va recollir sang dels animals per punció cardíaca. 0.5 mL d' aquesta sang es van recollir amb un tub d' EDTA i es van posar en gel. Es va procedir a la lisi dels eritròcits mitjançant l' addició de 5mL d' ACK buffer i a la neteja de la mostra amb 10 mL d' HBSS-Hepes. Es centrifugà la mostra a 1500 rpm durant 5 minuts i es repetí el procés lisi-neteja-centrífuga 3 vegades. Es descartà el sobrenedant obtingut en la tercera centrifugació i es ressuspengué el pellet amb 2mL de FACS buffer per obtenir, aproximadament, 200.000 cèl/100 µL.

Una vegada preparada la mostra (100 µL), es va procedir al bloqueig de la mateixa incubant-la amb 0.25µg de Mouse anti-Rat CD32 (eBioscience). Posteriorment es van incubar amb els 2 anticossos

durant 20 minuts: 0.4 µg d' Anti-Rat Granulocyte Marker PE (eBioscience) + 1 µg FITC Mouse Anti-Rat CD11b (eBioscience). Arribats a aquest punt, es procedí a la lectura de les mostres baixa velocitat. El citòmetre de flux utilitzat va ser un FacScalibur (Becton Dickinson <sup>TM</sup>, USA) i es van adquirir 10.000 events per cada mostra que posteriorment s'analitzaren amb el programa FCS Express (De Novo software, USA)

## 6.9 VALORACIÓ DE LES HEMORRÀGIES

### Visual score

Una vegada el cervell va ser seccionat i tenyit amb TTC es va procedir a una valoració macroscòpica de les hemorràgies. L' escala utilitzada va ser la mateixa que s' usa en clínica humana on:

HI: Infart amb petèquies sense efecte massa

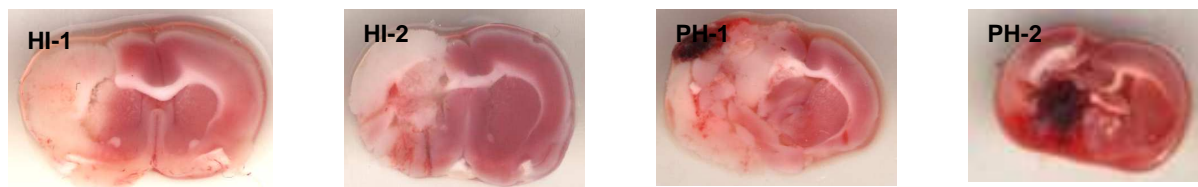
HI-1: Petèquies petites

HI-2: Petèquies confluents

PH: Regió homogènia de sang produint efecte massa

PH-1: ≤30% volum de la lesió

PH 2: ≥30% volum de la lesió



**Figura 14.**  
Puntuació de les hemorràgies a partir de valoració visual macroscòpica

### Western Blot

Paral·lelament a la valoració microscòpica de les hemorràgies, es va fer una valoració més quantitativa del contingut d' hemoglobina mitjançant Western Blot a partir d' homogenat cerebral. Cada animal es va representar amb dues mostres (hemisferi ipsilateral o isquèmic i hemisferi contralateral o no isquèmic), així l' hemisferi contralateral va servir de control intern per a cada un dels animals.

35µg de cada mostra van ser introduïts en un gel d' electroforesi al 8% de poliacrilamida. Una vegada separades, les proteïnes van ser transferides a una membrana PVDF mitjançant un Mini Trans-Blot®Electrophoretic Transfer Cell ( Laboratoris Bio-Rad) durant 1h a 100V. Per evitar unions no-específiques, es va bloquejar la membrana amb llet al 10% prèviament a la incubació overnight a 4°C amb els anticossos primaris :anti α Hemoglobina (Santa Cruz, 1:1000) i anti Actina (1:10.000). Posteriorment, els anticossos secundaris: Goat anti rabbit (1:2000) i anti mouse (1:2000) van ser

incubats durant 1 hora a temperatura ambient. Abans i després de les incubacions, les membranes van ser esbaldides 3 vegades (10 minuts cada una) amb PBS. Les membranes van ser revelades amb un reactiu de quimioluminescència: Luminol (Amersham, GE) i visualitzades mitjançant un analitzador d'imatges (Las-3000, Fujifilm, CT, USA). Finalment, les bandes escanejades del Western Blot van ser quantificades amb l'ajuda d'un programa informàtic anomenat Image Quantity One (Laboratori Bio-Rad).

## 6.10 ESTADÍSTICA

En el subprojecte del metanàlisi, les dades van ser analitzades mitjançant el programa informàtic SPSS. Es va calcular el número d' animals utilitzats, la mitja i la SEM (error estàndard de la mitja) o la SD (desviació estàndard) per a cada comparació (estatines vs control) per tal d'avaluar si el tractament amb estatines aportava un major benefici en els diferents paràmetres valorats.

L' efecte sobre el volum d'infart es considerarà la reducció del volum d' infart dels animals tractats expressat com a proporció del volum d'infart dels animals control.

El metanàlisi es realitzà usant les Diferències Ponderades de la Mitja (WMD) i el seu 95% d' Interval de Confiança (CI) amb efectes aleatoris per evitar l' heterogenicitat (Der Simonian R an Laird N), per tal de detectar diferències en l' efecte global estimat sobre el volum d'infart i el dèficit neurològic.

L'anàlisi estratificat es va dur a terme comparant diferents models animals (permanent o transitori), temps d'administració (pre o post tractament), tipus i números de dosis d' estatines. Per a avaluar les possibles diferències es van usar una t d' student o un test ANOVA.

En els subprojectes experimentals (posada a punt del model amb rates SHR, estudi d' incidència d' hemorràgies i estudi preliminar d' aparició d' infeccions) les dades van ser analitzades mitjançant el programa informàtic Graph Pad Prism\_v4. Les diferències significatives inter-grup de les dades paramètriques van ser calculades amb una t d' student o un test ANOVA. Per les dades no paramètriques, s' utilitzà el test Mann Whitney o el test Kruskal-Wallis. Les diferències significatives inter-grup referent a la mortalitat van ser calculades mitjançant el test de Fisher i les correlacions mitjançant el test de Pearson (per a les dades paramètriques) o el test d' Spearman (per a les dades no paramètriques)

Una p valor <0.05 va ser considerada estadísticament significativa amb un interval de confiança del 95% en tots els anàlisis.



## 7. RESULTATS

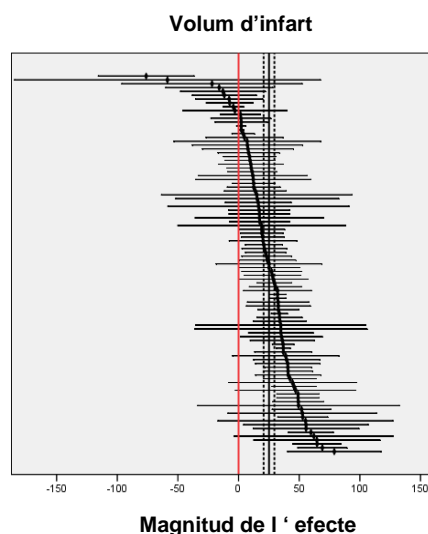
### 7.1 Resultats Metanàlisi

Realitzant una recerca electrònica mitjançant articles de Pubmed (1998-2010), es van incloure 47 treballs que valoraven l' efecte de les estatines en models d' isquèmia mitjançant l' oclusió de la MCA i es van analitzar estadísticament els següents paràmetres:

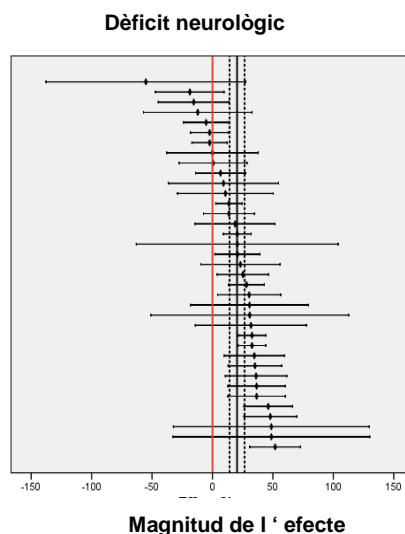
- l' efecte global de les estatines sobre el volum d' infart i el dèficit neurològic
- l' efecte estratificat sobre els mateixos paràmetres en funció de :
  - ✓ Qualitat dels articles (0-10)
  - ✓ Tipus d'estatina (Simvastatina, Atorvastatina o Rosuvastatina)
  - ✓ Moment d' administració (Pre o post isquèmia)
  - ✓ Model d' isquemia utilitzat (Transitori o Permanent)
  - ✓ Dosi simple o múltiple

En les següents gràfiques les línies horitzontals representen comparacions individuals per a cada estudi (on el rombe del mig representa la mitja de l' efecte); i les línies verticals corresponen a l'efecte global de totes les comparacions. La línia vertical contínua i discontinua representen la mitja i l' interval de confiança respectivament. Finalment, i per tal de poder interpretar les gràfiques, cal remarcar que els resultats que es troben sobre la línia vermella representen un efecte neutre de les estatines, els valors que queden a l' esquerra de la línia vermella representen un efecte negatiu de les estatines i els que queden a la dreta, representen un efecte positiu.

El tractament amb estatines va reduir l' infart un 25.12% [95% interval de confiança (IC:21.30%), (Figura 15)  $p < 0.001$ ] i millorà el dèficit neurològic un 20.36%, (IC: 14.17-26.56%),  $p < 0.001$  (Figura 16).



**Figura 15.**  
Efecte global de les estatines sobre el volum d'infart



**Figura 16.**  
Efecte global de les estatines sobre el dèficit neurològic



La qualitat dels estudis inclosos al metanàlisi (en un rang de 0-11) va ser moderada (4, interquartil rang 4-5). (Figura 17). La puntuació atorgada a cada treball es va referir al compliment de diferents punts, a destacar: monitorització del flux cerebral durant la cirurgia, utilització d'animals amb malalties concomitants, atorgament del tractament de manera aleatòria, valoració cega de l'estat neurològic dels animals, declaracions de possibles conflictes d'interès..

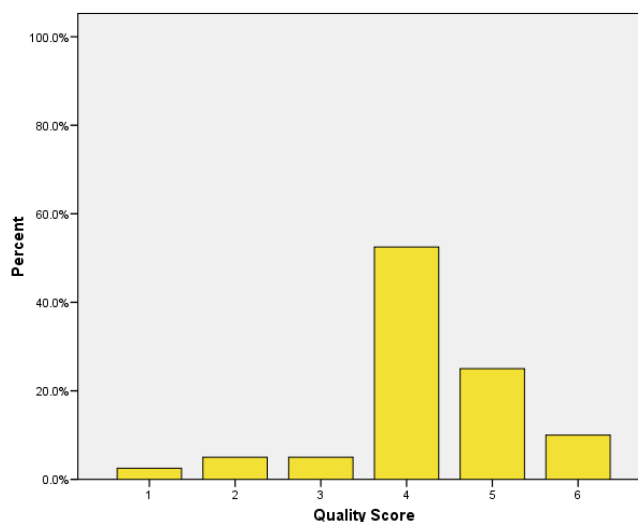


Figura 17. Anàlisi estratificat sobre la qualitat dels estudis inclosos al metanàlisi

Tenint en compte el **temps d'administració**, es veié que els animals que rebien les estatines com a pre-tractament mostraven una disminució significativa del volum d'infart respecte els animals que les rebien com a post-tractament [33.5% (28.47%-38.53%),  $p < 0.0001$ ] vs [16.02% (11.63%-20.42%)] (Figura 18). Per altra banda, no s'observaren diferències significatives entre administrar les estatines com a pre o post-tractament tenint en compte el dèficit neurològic [26.52% (15.05%-37.99%)] vs [14.36% (7.26%-21.48%)] (Figura 19).

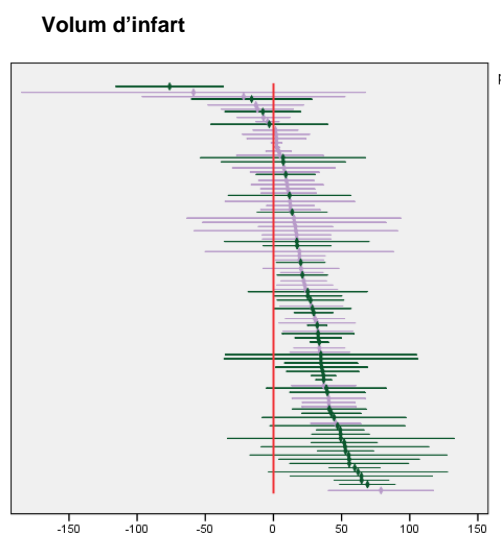


Figura 18 Magnitud de l'efecte

Efecte estratificat sobre el volum d'infart en funció del temps d'administració de les estatines

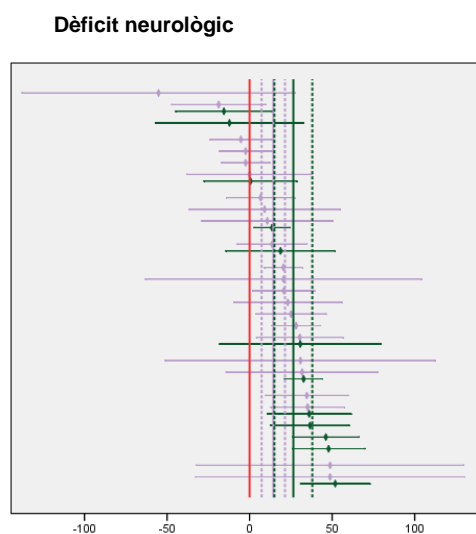
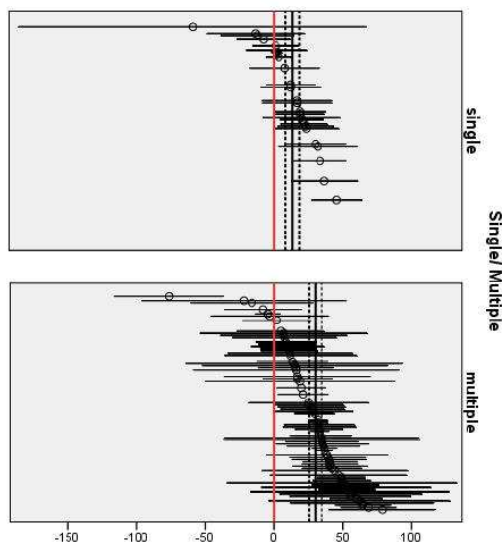


Figura 19 Magnitud de l'efecte

Efecte estratificat sobre el dèficit neurològic en funció del temps d'administració de les estatines

Pel que fa al **número de dosis**, els animals que reberen múltiples dosis d' estatines, presentaren una disminució significativa del volum d' infart respecte els animals que reberen una única dosi [30.08% (25.49%-34.68%)] vs [13.72% (8.76%-18.69%)]  $p=0.0002$ . (**Figura 20**). Per contra, no s' observaren diferències significatives entre els dos grups respecte al dèficit neurològic [20.76% (14.46%-27.06%)] vs [6.35% (-33.88%-46.58%)].(**Figura 21**).

**Volum d'infart**

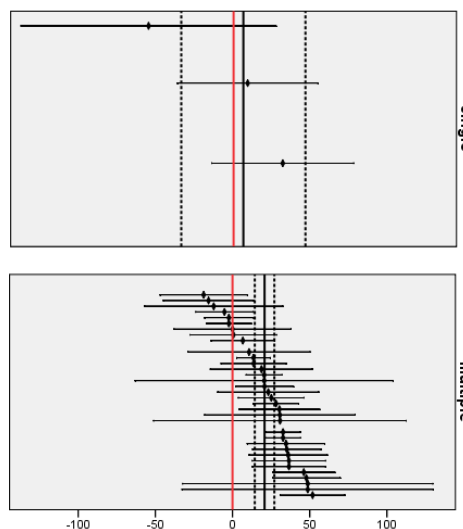


**Figura 20**

Magnitud de l'efecte

Efecte estratificat sobre el volum d' infart en funció del número de dosis d' estatines administrades

**Dèficit neurològic**



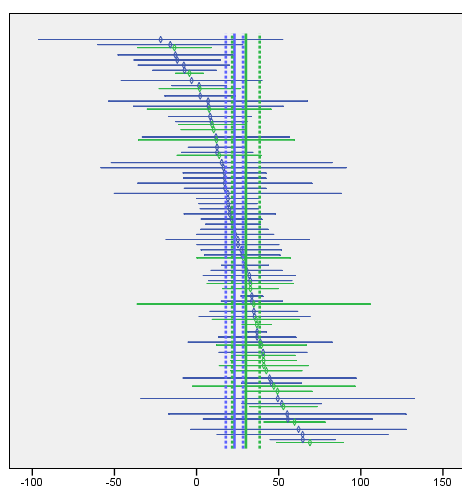
**Figura 21**

Magnitud de l'efecte

Efecte estratificat sobre el dèficit neurològic en funció del número de dosis d' estatines administrades

Respecte al **model emprat per a induir la isquèmia (transitori vs permanent)**, no es van observar diferències significatives ni en la reducció del volum d' infart [24.7% (20.38%-29.18%)] vs [25.48% (17.66%-33.29%)] (**Figura 22**) ni en la milloria del dèficit neurològic [23.05% (16.63%-39.46%)] vs [9.11% (-4.86%-23.08%)].(**Figura 23**)

**Volum d'infart**

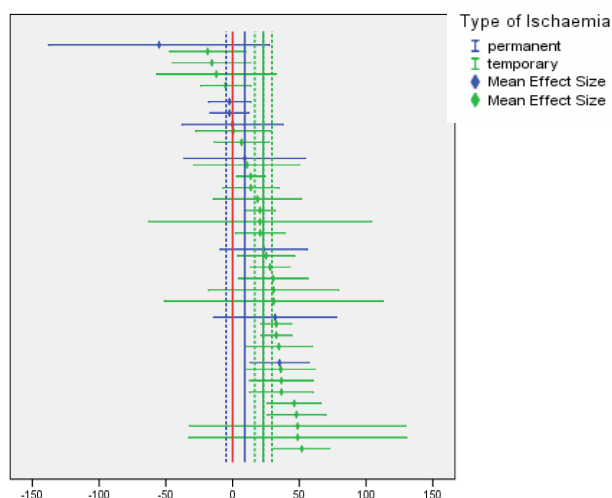


**Figura 22**

Magnitud de l'efecte

Efecte estratificat sobre el volum d' infart en funció del model animal utilitzat

**Dèficit neurològic**



**Figura 23**

Magnitud de l'efecte

Efecte estratificat sobre el dèficit neurològic en funció del model animal utilitzat

Finalment, es va tenir en compte el **tipus d' estatina** administrada, i es trobaren diferències significatives entre tots els grups pel que fa a la reducció del volum d'infart. Així doncs, els animals que rebien simvastatina era els que mostraven una major reducció del volum d'infart, seguits dels que rebien atorvastatina i finalment dels que rebien rosuvastatina [38.18% (33.23%-43.14%)] vs [23.71% (17.05%-30.38%)] vs [13.88% (6.54%-21.21%)].(Figura 24). Malgrat els resultats van en la mateixa direcció, no hi havia diferències significatives entre els grups pel que fa al dèficit neurològic [22.94% (12.16%-33.73%)] vs [19.24% (10.525%-27.96%)] vs [-0.27% (-18.9%-18.35%)].(Figura 25)

Volum d'infart

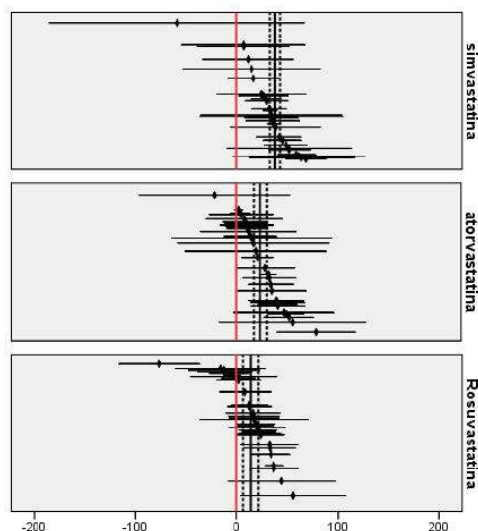


Figura 24

Magnitud de l'efecte

Efecte estratificat sobre el volum d' infart en funció del tipus d' estatina administrada

Dèficit neurològic

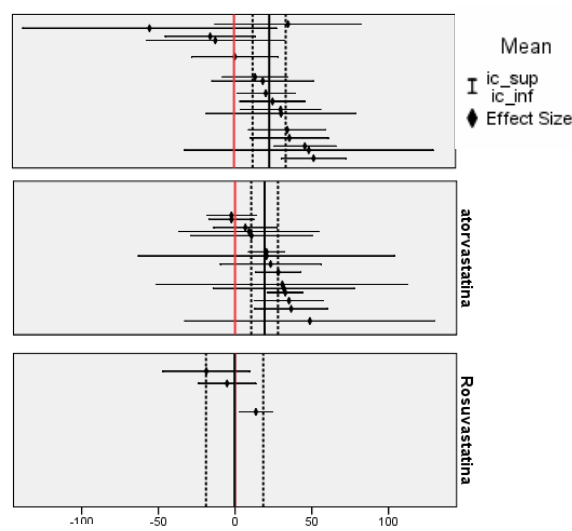


Figura 25

Magnitud de l'efecte

Efecte estratificat sobre el dèficit neurològic en funció del tipus d' estatina administrada

Realitzant **al nostre laboratori un model embòlic** i administrant als animals una sola dosi (20mg/Kg) de simvastatina com a post-tractament (15 min després de la isquèmia) es va comprovar que els animals tractats (n= 20) mostraven una disminució del volum d' infart (43%) (Figura 26) i una milloria del dèficit neurològic (35%)(Figura 27) respecte els animals control (n=12).

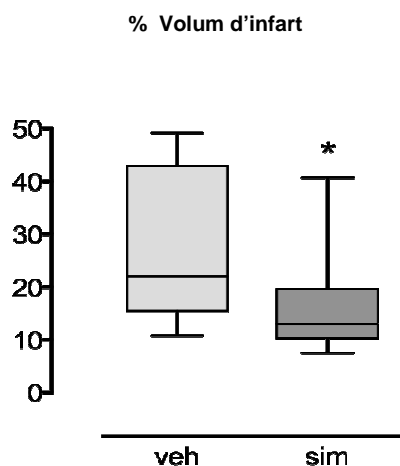


Figura 26

Representació del volum d' infart en %, mesurat amb tinció de tionina segons si els animals reben Vehicle o Simvastatina.

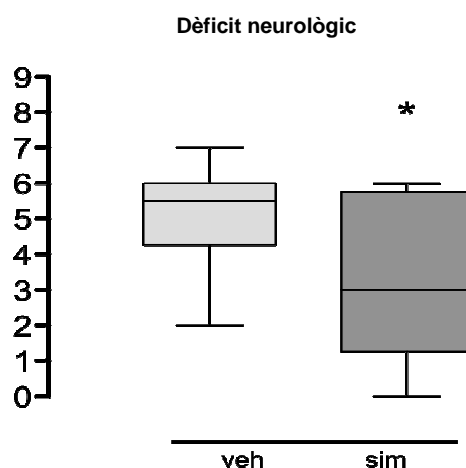


Figura 27

Representació del dèficit neurològic valorat amb l' escala de bederson modificada (0-9) segons si els animals reben Vehicle o Simvastatina.

Analitzant conjuntament els resultats obtinguts a les nostres mans amb altres resultats ja publicats on també s' administrava la Simvastatina com a post- tractament ( Nagaraja et al 2006, Chen et al 2003 i Guluma et al 2010) es va poder veure que els nostres resultats anaven en concordança amb els resultats ja publicats, on s' usaven altres models. (Figura 28)

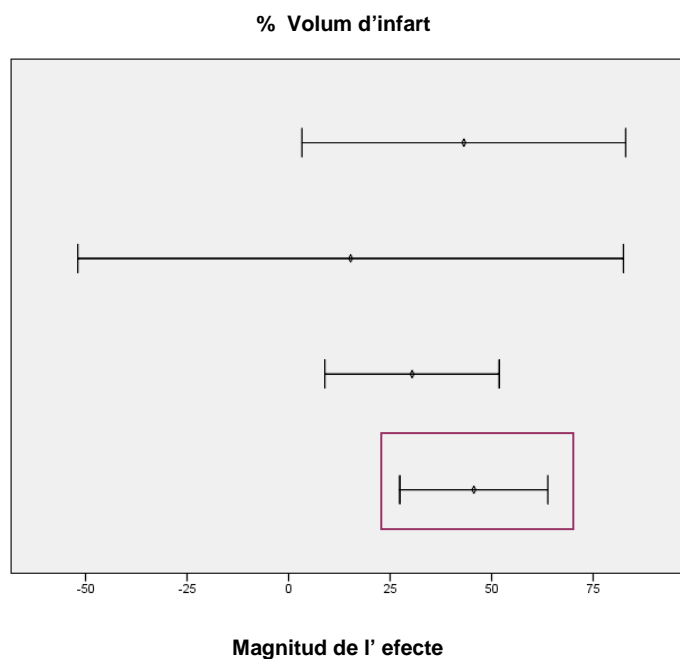


Figura 28

Comparació dels resultats obtinguts al nostre laboratori, amb altres 3 estudis ja publicats on també administraven la Simvastatina com a post-tractament

## 7.2 Resultats posada a punt del model amb rates hipertenses

Una vegada es va haver comprovat l'eficàcia de les estatines en el nostre model (oclusió de lla MCA mitjançant un coàgul) ens vam proposar estudiar una de les complicacions més freqüents en clínica humana després de l'administració de l'rt-PA (únic tractament aprovat actualment per a la fase aguda de l'ictus): LES TRANSFORMACIONS HEMORRÀGIQUES. Per a tal fi es va creure oportú usar rates hipertenses (SHR) amb més tendència a presentar hemorràgies, i va ser necessari posar a punt el model (mida i número de coàguls i temps d'administració de l'rt-PA) ja que realitzant les cirurgies tal com s'havia fet amb les rates normotenses la mortalitat obtinguda era inacceptable. A continuació es mostren una sèrie de taules on es representen el número d'animals utilitzats en la posada a punt del model, el número d'inclosos i exclosos i els motius d'exclusió d'aquests últims. (**Taula 1**) La majoria d'animals que van ser exclosos va ser perquè van morir abans de les 24 hores, degut a la forta oclusió, a complicacions en la cirurgia o a parades cardio-respiratòries durant la mateixa. Altres animals van ser exclosos perquè no es va veure la baixada del flux sanguini cerebral en introduir el coàgul (no embolització) i finalment, un altre grup d'animals van haver de ser exclosos perquè una vegada introduït el coàgul i havent disminuït el flux sanguini cerebral, es va veure com aquest tornava al seu valor basal sense haver administrat prèviament cap medicament. Seguidament es mostren els diferents grups estudiats per escollir el tipus de coàgul (**Taula 2**), els paràmetres fisiològics valorats (pes i pressió arterial sistòlica) abans de ser sotmesos a la isquèmia cerebral. (**Taula 3**), i els paràmetres avaluats posteriorment a la inducció de la isquèmia per tal d'escollir el tipus de coàgul més adequat per a dur a terme el nostre projecte (**Figures 32,33 i 35**).

Animals 85			
Inclosos	62	ok	37
		exitus	25
Exclosos	23	No embolització	5
		Reperussió espontània	5
		Èxitus abans 24h	13

**Taula 1.** Resum de tots els animals que es van utilitzar per a posar a punt el model amb rates SHR. El número d'inclosos a l'estudi, el número d'exclosos i les causes d'exclusió dels mateixos.

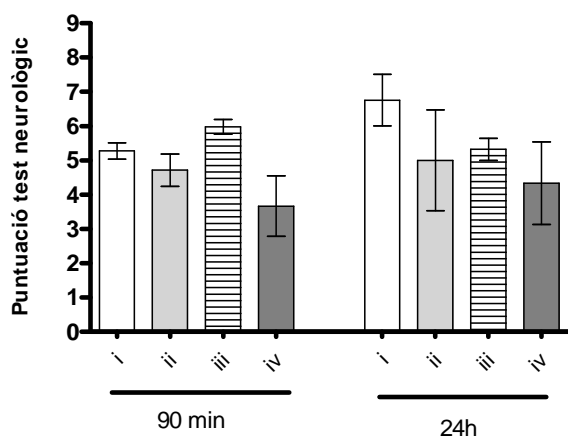
Grup	Tipus de coàgul	Nº total animals	inclosos
i	Sang arterial amb trombina 2x1.5 cm	12	10
ii	Sang arterial amb trombina 1x1.5 cm	8	7
iii	Sang arterial sense trombina 3x1 cm	61	43
iv	Sang venosa sense trombina 3x1cm	4	2

**Taula 2.** Es representen els diferents grups estudiats per a trobar el tipus més adequat de coàgul per a dur a terme l'estudi. El tipus de coàgul varia en funció de la sang (arterial o venosa), de la presència o no de trombina, i del número i mida dels coàguls.

Grup	Pes (g)	PA sistòlica (mmHg)	% Oclusió (PU)
i	299,5 ± 8.26	191 ± 21.48	87,58 ± 6.25
ii	318 ± 10.21	217,66 ± 9.45	88,722 ± 7.62
iii	298,53 ± 17.81	189 ± 27.85	83,31 ± 9.31
iv	320 ± 0	201,3 ± 7.07	82,7 ± 0.99

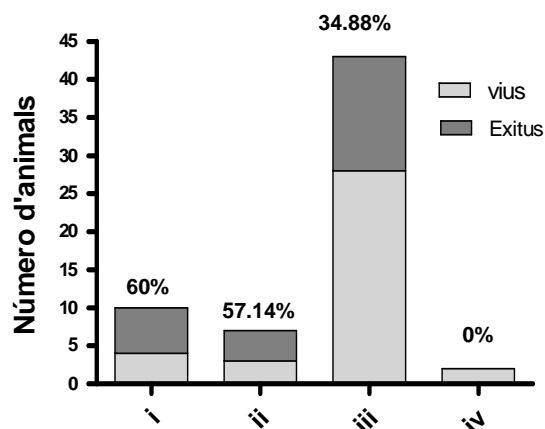
**Taula 3.** Es mostren la mitja +/- SD dels valors obtinguts per als paràmetres fisiològics (pes i pressió arterial) i el % d' oclusió dels diferents grups segons el tipus de coàgul utilitzat. S' observa que no hi ha diferències significatives entre els grups, és a dir, que tots els animals parteixen de les mateixes condicions.

Una vegada realitzada la cirurgia amb els diferents tipus de coàguls, es procedí a valorar el dèficit neurològic, la mortalitat i les hemorràgies dels diferents grups per tal de poder escollir el model animal més adequat per al nostre projecte. No s' observaren diferències significatives entre els diferents grups pel que fa al dèficit neurològic (**Figura 29**), ni tampoc pel que fa a la mortalitat (**Figura 30**). En aquest últim cas, probablement degut al diferent número d'animals inclosos en els grups. Referent a les hemorràgies, usant una escala de valoració freqüent en clínica humana (ECASS) (**Taula 4**) es comprovà que el grup *i* (2 coàguls d' 1.5cm) era el que presentava més incidència de transformacions hemorràgiques seguit del grup *iii* (1 únic coàgul de 3cm) i que els animals del grup *iv* (sang venosa, un sol coàgul de 3 cm ) no presentaven transformacions hemorràgiques (**Figura 31**).



**Figura 29.** Representació del dèficit neurològic dels diferents grups segons el tipus de coàgul utilitzat i a partir de l' escala de Bederson Modificada (0-9). Es realitzaren tests als 90 min i a les 24 h post isquèmia

Kruskal-Wallis test P value = 0.0424 Post test  $p > 0.05$

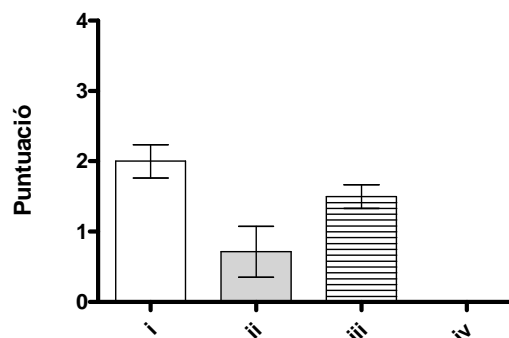


**Figura 30.** Representació de la mortalitat a les 24h segons el tipus de coàgul utilitzat.

Chi-square  $P = 0.229$

0 = No hemorràgia
1 = HI-1 : petèquies petites
2 = HI-2 : petèquies confluents
3 = PH-1 : regió homogènia de sang $\leq$ 30% volum de la lesió
4 = PH-2 : regió homogènia de sang $\geq$ 30% volum de la lesió

**Taula 4.** Escala ECASS per a la valoració d'hemorràgies de manera visual.



**Figura 31.** Gràfica on es representa la puntuació ECASS atorgada als animals. La valoració va ser realitzada post-mortem, i posteriorment a la tinció del cervell amb TTC

Kruskal-Wallis test P value= 0.0228 Post test p>0.05

Una vegada realitzades les gràfiques i tenint en compte els resultats, es decidí que el grup que millor representava el que volíem era el iii, és a dir, el que s'havia usat un sol coàgul de sang arterial sense trombina. Tot i que les diferències no eren significatives, era el grup que presentava un millor equilibri aparició d' hemorràgies – mortalitat. És adir, els animals presentaven importants transformacions hemorràgiques però la mortalitat era acceptable (34.88%).

Arribats a aquest punt, es va dissenyar un segon estudi per tal de decidir el moment més òptim (sempre després de la isquèmia) per a l' administració de l' rt-PA en el nostre model. Es van comparar diferents paràmetres tenint en compte si els animals no rebien rt-PA, si el rebien 1.5h després de la isquèmia o 3h després de la mateixa (**Taula 5**). No es van observar diferències significatives entre els 3 grups pel què fa als paràmetres fisiològics i al percentatge d' oclusió (**Taula 6**), pel que podem afirmar que cap d'aquests paràmetres va influir en els resultats obtinguts posteriorment.

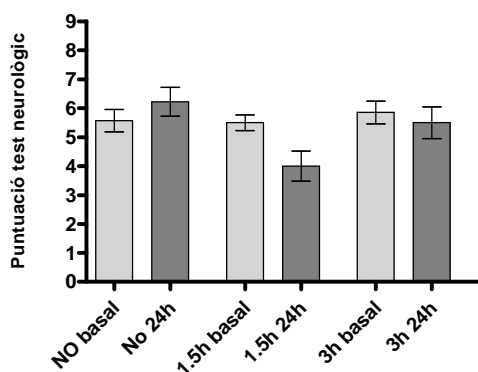
Administració de tPA	No rt-PA	1,5h	3h	TOTAL
Nº d'animals	12	9	15	36

**Taula 5.** Número d'animals inclosos en cada un dels grups segons el temps d'administració de l'rt-PA

Grup	Pes (g)	PA sistòlica (mmHg)	% Oclusió (PU)
No rt-PA	298+ 3,08	165,64 + 18,38	81,89 + 9,11
1,5h	287,33 + 14,74	178,9 + 20,59	89,35 + 6,532
3h	289,75 + 36,49	177,77 + 24,92	84,462 + 12,93

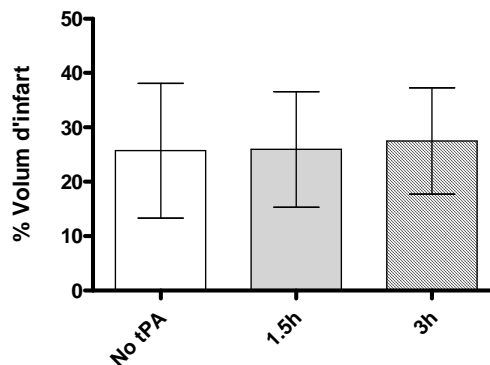
**Taula 6.** Mitja +/- SD dels valors obtinguts per als paràmetres fisiològics (pes i pressió arterial) i el % d' oclusió dels animals dels diferents grups. S' observa que no hi ha diferències significatives entre els grups, és adir, que tots els animals parteixen de les mateixes condicions.

Tenint en compte que no es van observar diferències significatives entre els 3 grups d'estudi pel que fa al dèficit neurològic (**Figura 32**), i al volum d'infart (**Figura 33**), es podria dir que el dany cerebral que causa la isquèmia realitzada amb aquest model (MCAOe) en aquesta soca de rates (SHR) és tan sever que no s'observen canvis si es procedeix a la recanalització de l' artèria ocluída mitjançant l' rt-PA.



**Figura 32.** Representació de la puntuació neurològica obtinguda usant el test de Bederson modificat (0-9) realitzat als 90 minuts després de l' oclusió i a les 24 hores de la mateixa.

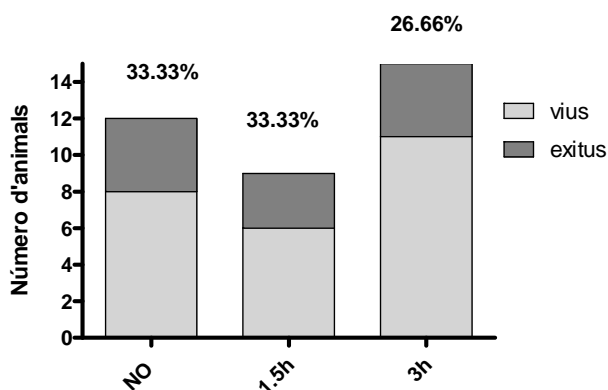
Kruskal-Wallis test P value = 0.12



**Figura 33.** Representació del % del volum d' infart calculat després de ténir els cervells amb TTC.

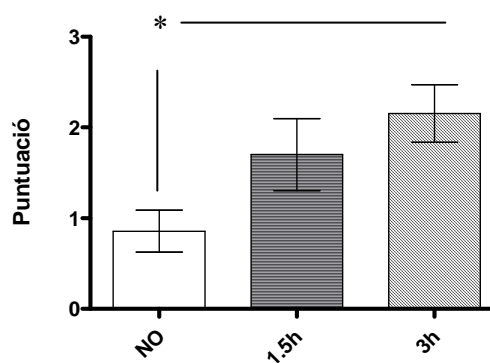
Kruskal-Wallis test P value = 0.83

La mortalitat era pràcticament igual en els 3 grups (**Figura 34**), però sí s' observaren diferències pel que fa a la incidència d' hemorràgies, on es va veure que el grup que rebia l' rt-PA a les 3 hores de la isquèmia, presentava una puntuació significativament superior al grup que no rebia rt-PA i superior al grup que rebia l' rt-PA a 1.5 hores després de la isquèmia(**Figura 35**).



**Figura 34.** Representació de la Mortalitat a les 24h post isquèmia segons el temps d'administració de l'rt-PA

Chi-square P value = 0.912



**Figura 35.** Representació de la incidència d'hemorràgies (valorada amb l' escala ECASS) segons el temps d'administració de l' rt-PA

Kruskal-Wallis test P value = 0.016

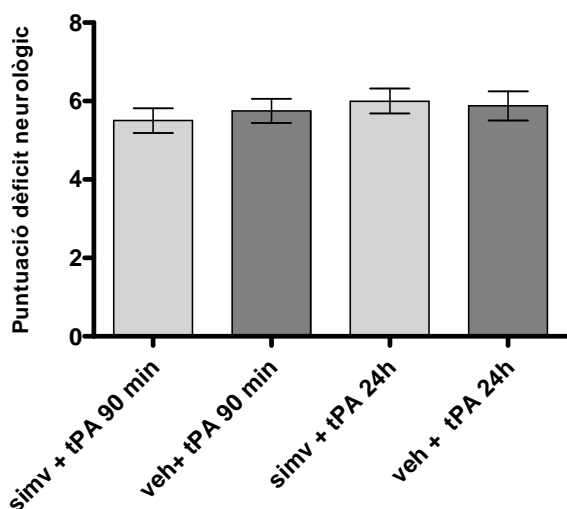
Ja que la mortalitat del grup on s'administrava l' rt-PA a les 3 hores no era major que la del grup de 1,5 hores però sí que ho era la incidència d' hemorràgies, vam creure que el model més adequat era el que administrava el trombolític les 3 hores. Així doncs, quedà establert el nostre model per a l'estudi d' aparició d' hemorràgies en rates hipertenses: es procediria a l' oclusió de l' ACM mitjançant un sol coàgul de sang arterial sense trombina i de 3 cm, s' administraria una sola dosi de Simvastatina als 15 minuts de l' oclusió i. Finalment, a les 3 hores de la isquèmia, s'administraria l' rt-PA.



### 7.3 Resultats estudi de la incidència d'hemorràgies en rates hipertenses

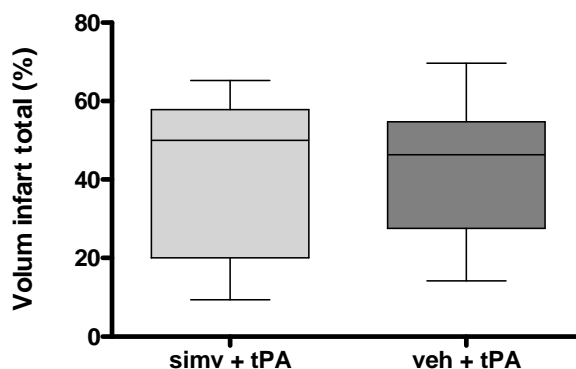
28 rates de la soca SHR (hipertenses) van ser sotmeses a una isquèmia cerebral mitjançant un model embòlic (MCAOe). 15 minuts després de l'oclusió se'ls hi administrà Simvastatina (n=13) o Vehicle (n=15). 3 hores després de l'oclusió, tots els animals rebien rt-PA via endovenosa. 24 hores després de l'oclusió, els animals van ser sacrificats. Diferents paràmetres van ser valorats per avaluar l'efecte que podria tenir l'administració de Simvastatina en la fase aguda de la isquèmia, sobre la incidència de transformacions hemorràgiques.

A tots els animals se'ls hi realitzà el test de Bederson (puntuació de 0-9) als 90 minuts després de la isquèmia i just abans del sacrifici (24h post isquèmia). Els resultats van mostrar que la puntuació era pràcticament igual tant entre els 2 grups d'animals com entre els 2 temps dins d'un mateix grup (**Figura 36**). Pel que fa al percentatge de volum d'infart calculat a les 24h de la isquèmia mitjançant tinció amb TTC, es comprovà que era pràcticament idèntic tant per als animals que rebien Simvastatina com per als que rebien Vehicle (**Figura 37**). Tampoc s'observaren diferències significatives quan es valorava per separat el % d'infart que corresponia a la zona sub-cortical (estriat, hipocamp i tàlem) (**Figura 38**) i el que corresponia a la zona cortical (**Figura 39**).



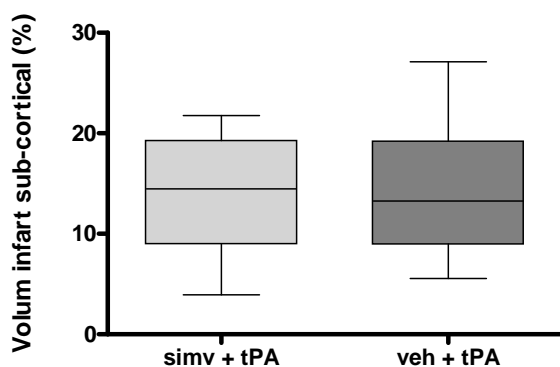
**Figura 36.** Valoració del dèficit neurològic mitjançant el test de Bederson Modificat als 90 minuts i a les 24 hores després de la isquèmia.

Kruskal -Wallis test P value = 0.7245



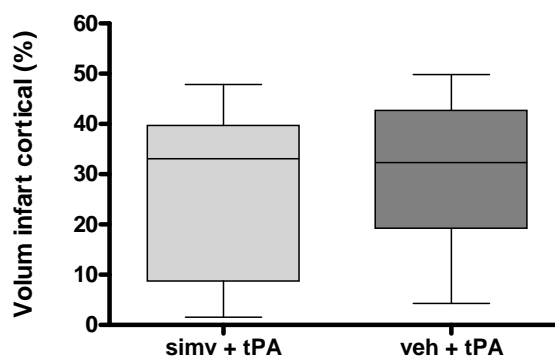
**Figura 37.** Representació del percentatge d'infart total mesurat a les 24 hores de la isquèmia mitjançant tinció amb TTC.

Mann Whitney test P value = 0.963



**Figura 38.** Representació del percentatge d' infart corresponent a la zona sub-cortical valorat mitjançant tinció amb TTC a les 24 hores de l' infart.

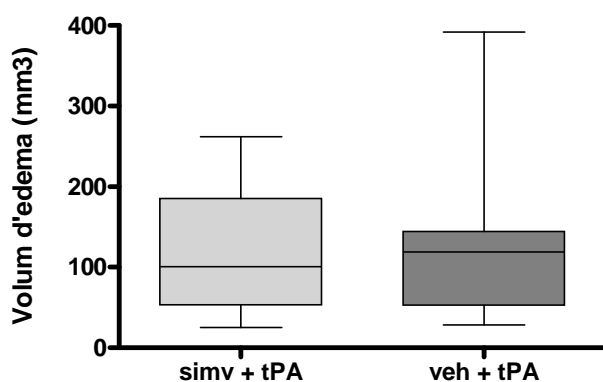
Mann Whitney test P value = 0.963



**Figura 39.** Representació del percentatge d' infart corresponent a la zona sub-cortical valorat mitjançant tinció amb TTC a les 24 hores de l' infart.

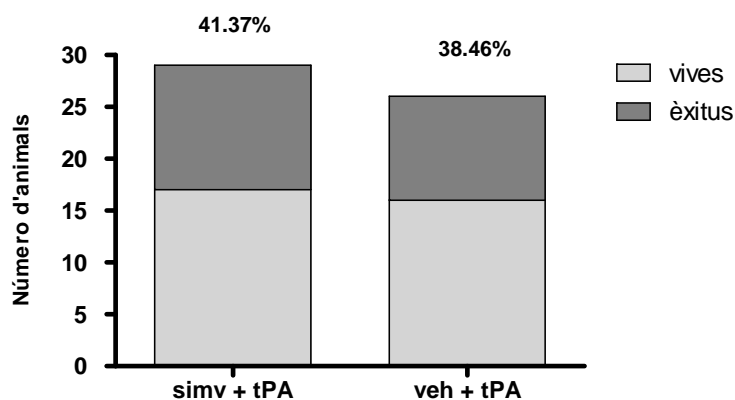
Mann Whitney test P value = 0.8178

No es van trobar diferències significatives entre els 2 grups pel que fa al volum d'edema (**Figura 40**), i el percentatge de mortalitat degut a la isquèmia i/o l' hemorràgia induïda després de l'administració de l' rt-PA va ser idèntica entre els 2 grups (**Figura 41**).



**Figura 40.** Representació del volum d'edema calculat a les 24h de l' oclusió.

Mann Whitney test P value = 0.8901

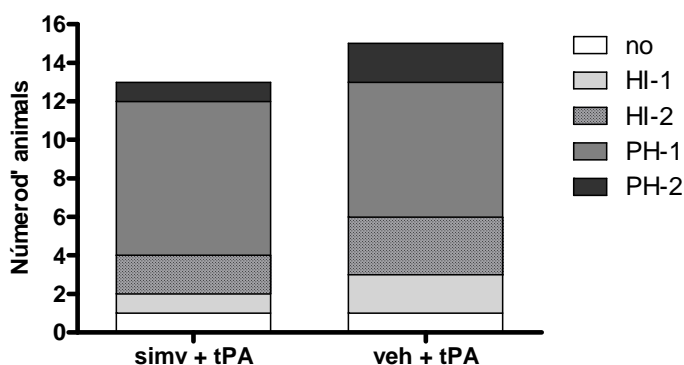


**Figura 41.** Mortalitat a les 24 hores de l' oclusió.

Fisher's exact test P value = 1

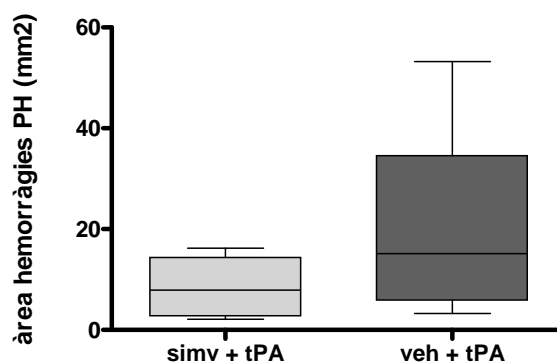
Finalment es va procedir a la valoració de les hemorràgies. Es va realitzar primerament una valoració visual, prèvia tinció dels cervells amb TTC, segons la puntuació de l'escala ECASS. El resultat va ser que no hi havia diferències en quant al tipus d'hemorràgia observada si es tenia en compte si els animals rebien o no Simvastatina (**Figura 42**). A més, cal destacar que la majoria d'animals d' ambdós grups mostraven hemorràgies tipus PH (simv = 69.23%, veh=60%). També es va procedir a calcular l' àrea d' hemorràgies tipus PH dels 2 grups mitjançant el programa informàtic ImageJ. En aquesta

segona valoració es va poder demostrar una clara tendència a que els animals tractats amb Simvastatina mostressin àrees hemorràgiques menors que els tractats amb vehicle (**Figura 43**). Només es van valorar les hemorràgies tipus PH perquè eren les úniques en què es podia delimitar l' àrea.



**Figura 42.** Representació de la distribució per grups segons el tipus d'hemorràgia observada i aplicant la puntuació ECASS.

Chi-square P value = 0.9392

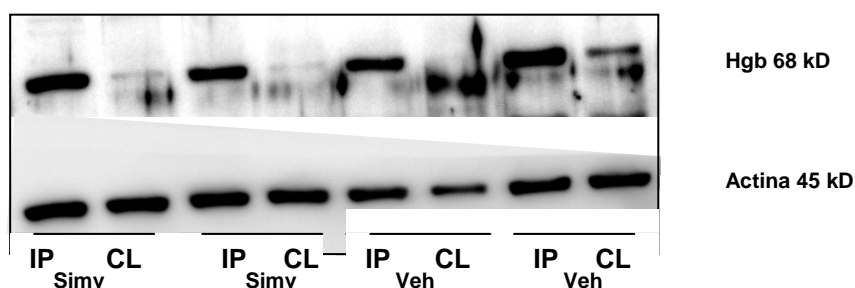


**Figura 43.** Càlcul de l' àrea hemorràgica mitjançant programa ImageJ dels animals que presentaven hemorràgies tipus PH.

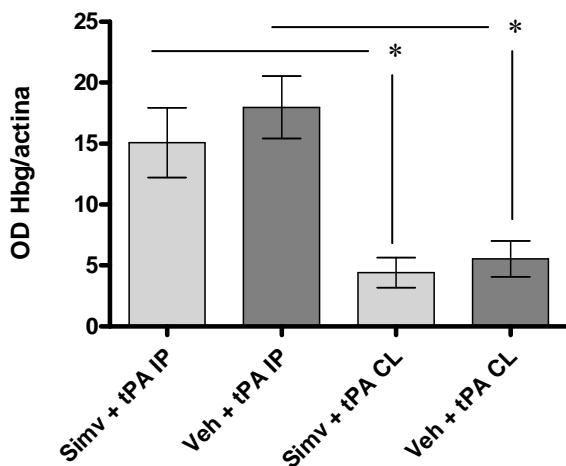
Mann Whitney test P value = 0.0939

Finalment es va procedir a quantificar el contingut d' hemoglobina en homogenat cerebral mitjançant Western Blot (**Figura 44**) per tal de tenir una valoració més quantitativa i objectiva sobre la incidència que podria tenir la Simvastatina en l' aparició de TH. Els resultats van revelar diferències significatives entre les mostres IP (hemisferi infartat) i CL (hemisferi no isquèmic) d' ambdós grups. Per contra, no s' observaren diferències significatives entre els animals tractats amb Simvastatina i els tractats amb Vehicle (**Figures 45 i 46**).

Els resultats obtinguts amb les diferents tècniques usades per a valorar les hemorràgies cerebrals van ser comparats mitjançant correlacions (**Figures 47 A, B i C**). Es comprovà que hi havia una perfecta correlació entre la puntuació amb el sistema ECASS i el càlcul de l'àrea hemorràgica (**Figura 47 A**) però no entre aquestes dues tècniques i els resultats obtinguts per WB (**Figures 47 B i C**).

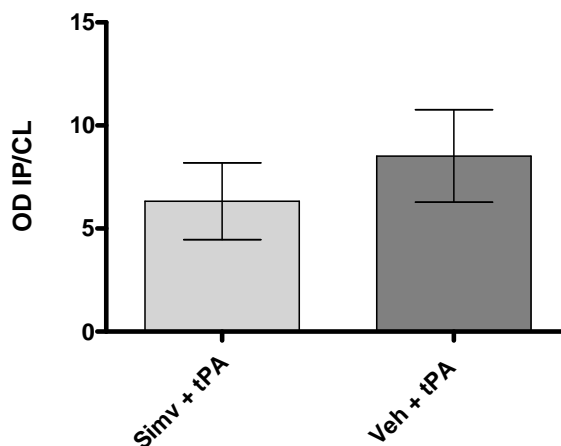


**Figura 44.** Aspecte de les membranes del WB on s'aprecia que l' Hemoglobina es concentra a l'hemisferi ipsilateral o infartat del cervell dels animals sotmesos a una MCAOe (24h abans) i que han rebut rtPA a les 3 hores de l'oclusió.



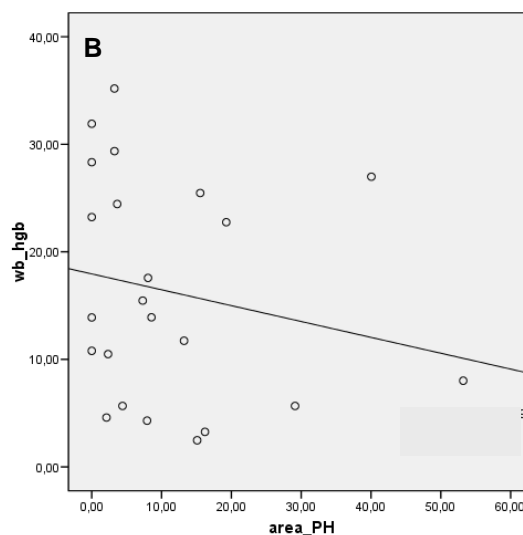
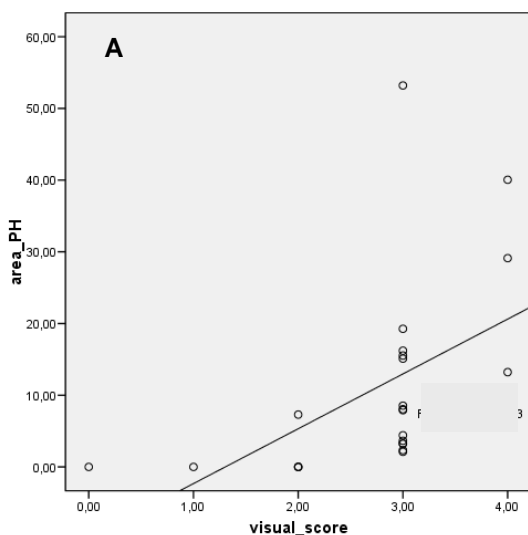
**Figura 45.** Quantificació del contingut d'hemoglobina mitjançant WB a partir d' homogenats cerebrals de rates isquèmiques. Resultats representats a partir de les densitats òptiques (OD) de l'Hbg/ actina.

Kruskal -Wallis test P value <0.0001



**Figura 46.** Quantificació del contingut d'hemoglobina mitjançant WB i representat com a ratio IP/CL per a cada un dels grups.

Mann Whitney test P value = 0.2894

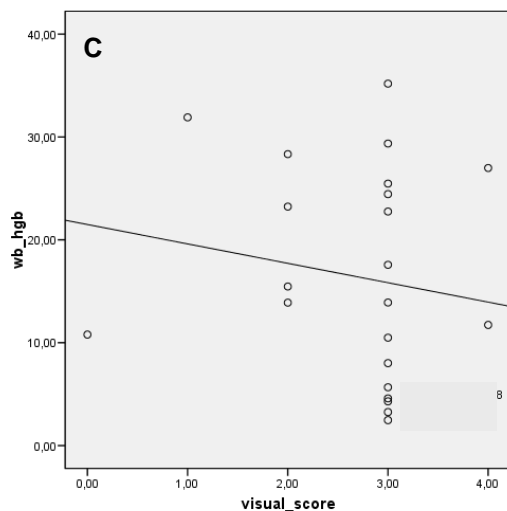


**Figura 47.** Correlacions entre les diferents tècniques usades per a la valoració d' hemorràgies on:

**A** Correlació entre l'àrea mesurada de les mostres amb sagnats tipus PH i la valoració ECASS (0-4)  
Spearman's test p value<0.01

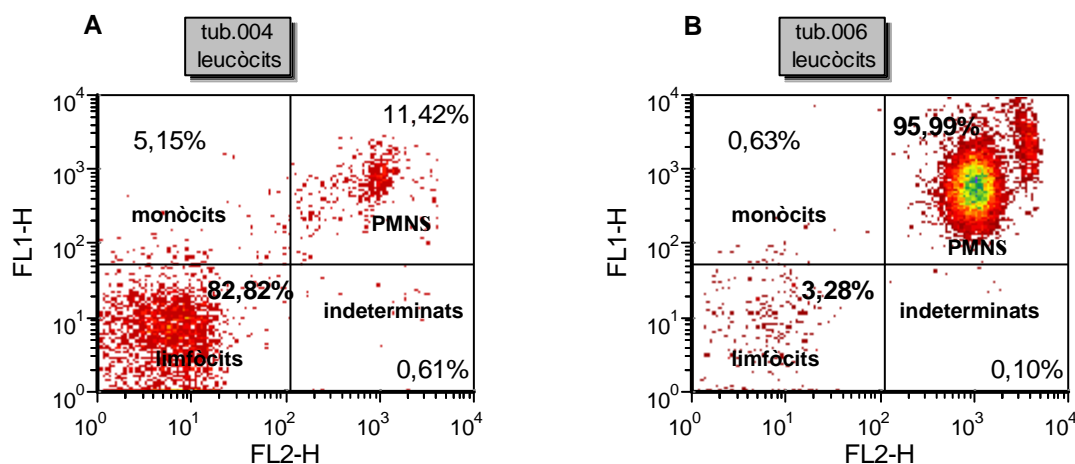
**B** Correlació entre la densitat òptica valorada mitjançant WB i l' àrea mesurada de les mostres amb sagnats tipus PH  
Spearman's test p value >0.05

**C** Correlació entre la densitat òptica valorada mitjançant WB i la valoració ECASS (0-4)  
Spearman's test pvalue>0.05



#### 7.4 Resultats preliminars estudi d' infeccions després de la isquèmia

A continuació es presenten els primers resultats referents a l' estudi d'aparició d'infeccions 48 hores després de la isquèmia cerebral. 5 grups de 4 animals cada un van ser sotmesos a una MCAOe (animals isquèmics), a la mateixa cirurgia sense introduir el coàgul sanguini (animals Sham) o no van ser intervinguts de cap manera (animals control). 48 hores després de la intervenció, els animals van ser sacrificats i es van recol·lectar 500  $\mu$ L de sang que va ser processada per a realitzar un recompte de polimorfonuclears (PMN's) i limfòcits (limfos) mitjançant citometria de flux (**Figura 48**).



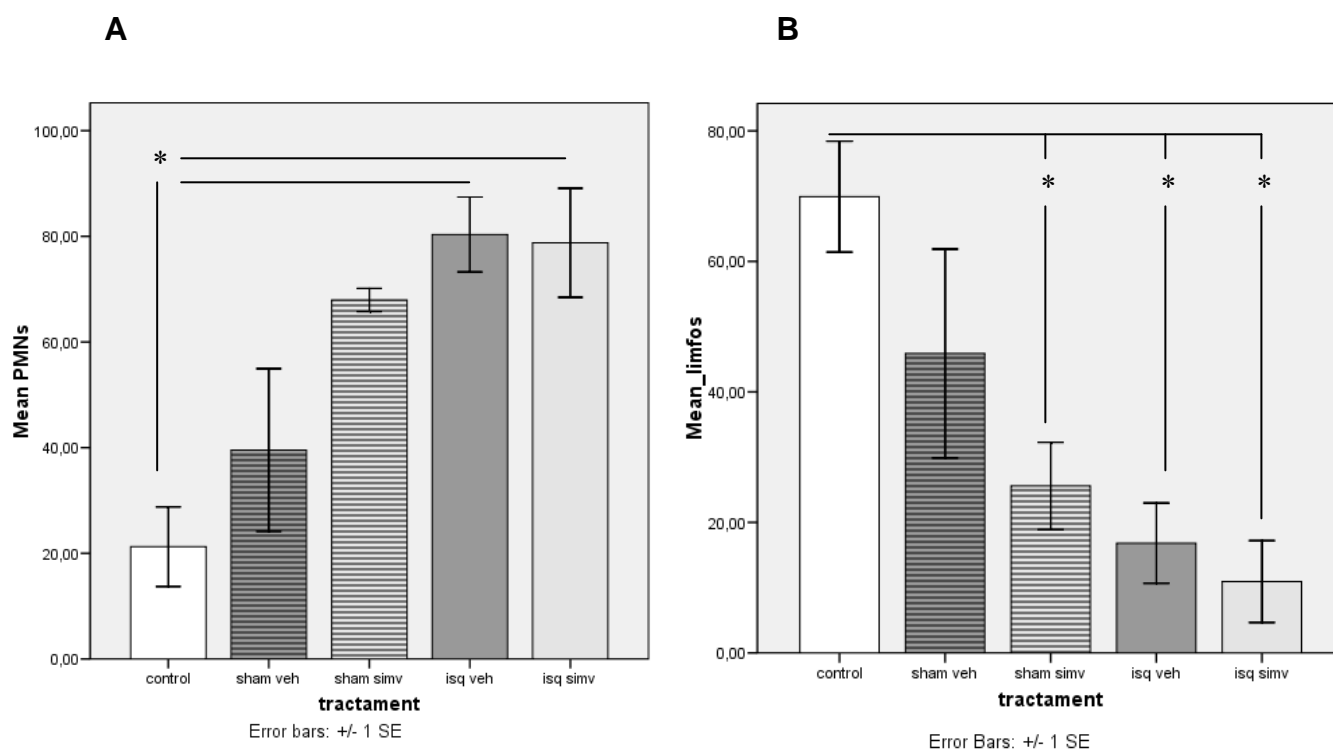
**Figura 48.** Gràfiques de citometria de Flux

Es mostra el percentatge de cada una de les poblacions cel·lulars estudiades amb la citometria de flux on A correspon a una mostra d' un animal control i B a una mostra d' un animal isquèmic. FL1-H correspon a l' anticòs CD11B conjugat amb Fitc i FL2-H correspon a Anti-Granulocyte Marker conjugat amb PE.

Els animals Sham mostraren un percentatge de PMN's més elevat que els control i els animals isquèmics més elevat que els 2 anteriors. Només es detectaren diferències significatives entre els animals control i els isquèmics. Per altra banda, i el més interessant, es que no es van veure diferències significatives entre els animals que van rebre Vehicle i els que van rebre Simvastatina (**Figura 49 A**). Amb tot això podem dir que el % de PMN's en sang augmenta després del procés quirúrgic a què són sotmesos els animals (Sham i MCAOe) i augmenta encara més quan pateixen una isquèmia cerebral (MCAOe). Per altra banda podem assegurar que el % de PMN's en sang no s'altera amb l' administració de Simvastatina.

Pel que fa al recompte de limfòcits (**Figura 49 B**), els resultats van ser inversos als obtinguts pels PMN's. Així, es va observar que els animals control comptaven amb un percentatge de limfòcits dins el rang de normalitat i que els animals Sham presentaven un recompte de limfòcits inferior als control (en el cas dels Sham tractats amb Simvastatina significativament inferior als control, fet que caldrà estudiar amb més deteniment en estudis posteriors). Els animals isquèmics, i com era d' esperar, van mostrar recomptes de limfòcits significativament inferiors als animals control i inferiors als animals Sham.

En aquesta fase de l' experiment no podem dir que l' augment de PMN's en sang sigui degut a una infecció. Per a poder fer aquesta afirmació són necessaris més experiments complementaris que s' estan posant a punt actualment (realització de recomptes de colònies bacterianes a partir d' homogenat pulmonar, valoració d'histologia pulmonar..)



**Figura 49.** Gràfica on es representa el percentatge de PMN's (**A**) i el percentatge de limfòcits (**B**) en sang valorats mitjançant citometria de flux 48 hores després de la isquèmia o de la cirurgia SHAM. N = 4 animals per grup.

Bonferroni test \* p < 0.01

## 8. DISCUSSIÓ

Existeixen múltiples treballs experimentals que assenyalen el benefici de les estatines en la isquèmia cerebral, les quals actuen reduint el volum de la lesió isquèmica i millorant el dèficit neurològic, tal i com es confirma en el metanàlisi realitzat en aquest treball. Entre les estatines, la Simvastatina és la que sembla exercir el major benefici. En el nostre model d'oclusió embòlica, la Simvastatina administrada com a post tractament reduí el volum de l' infart en un 43% i millorà el dèficit neurològic en un 35% respecte del control.

Els resultats del nostre primer estudi o metanàlisi van revelar que les estatines exercien, de manera general, un efecte beneficiós quan s' usaven com a tractament per a la isquèmia cerebral. Aquest efecte beneficiós es traduïa amb una reducció del volum d' infart i amb una millora del dèficit neurològic i era més notori quan les estatines eren administrades prèviament a la isquèmia cerebral que quan eren administrades com a post tractament. Aquest punt explicaria l' efecte beneficiós que té estar prenent estatines en el moment de l' ictus sobre l' evolució neurològica, tant en pacients que reben tPA (Alvarez-Sabín et al; 2007) com en els que no reben cap tractament de reperfussió (Martí- Fàbregas et al; 2004). Pel que fa al número de dosis administrades, també es va observar que la reducció de la mida de l' infart era significativament superior quan s' administraven múltiples dosis d' estatines si es comparava amb quan s' administrava una sola dosi. En referència al tipus d' estatina administrada, malgrat l' administració de qualsevol de les 3 estatines comportava una reducció significativa, es comprovà que la Simvastatina era la que aportava una major reducció del volum de l' infart, seguida de l' Atorvastatina i de la Rosuvastatina. Aquestes dades concordaven amb articles ja publicats (Sierra et al 2011), on, mitjançant estudis in vitro demostraven que la Simvastatina era l' estatina (entre 8 altres estudiades) que pel seu grau de liposolubilitat, capacitat per travessar la BHE i disminuir la mort neuronal, presentava un major efecte neuroprotector. No es van trobar diferències significatives en comparar diferents models animals utilitzats per a induir la isquèmia cerebral, fet que contribueix a demostrar que les estatines aporten beneficis com a tractament de la isquèmia cerebral, independentment de quin sigui el model animal escollit. Aquest fet aporta grans avantatges, ja que per a fer estudis de paràmetres concrets, pot interessar més fer un model o un altre.

D' aquesta primera recerca bibliogràfica caldria destacar, també, que en la majoria de paràmetres valorats ( temps d'administració, número de dosis i tipus d' estatina administrada) es van trobar diferències significatives per a la disminució de la mida de l' infart, però no per a la milloria del dèficit neurològic. Aquest fet tindria varies explicacions estadístiques. Per una banda, el número d'estudis inclosos en el metanàlisi que valoraven l'efecte de les estatines mitjançant tests neurològics era molt menor que els que el valoraven mitjançant el càlcul del volum d'infart. Per altra banda, no tots els treballs utilitzaven el mateix test neurològic, sinó que existeix una gran varietat de maneres de valorar l' estat neurològic d'un animal isquèmic. Per exemple, Cui et al (2009) en el seu treball, realitza 3 tests diferents: adhesive-removal test, foot –fault evaluation i mNSS, cada un d' ells amb un rang de puntuació diferent; en canvi, Shabanzadeh et al (2005) usa el test de Bederson modificat igual que

nosaltres, on la puntuació té un rang de 0 al 9. També cal tenir en compte que la valoració de l'estat neurològic d' un animal, sigui quin sigui el test utilitzat, no deixa de ser una mesura subjectiva, al contrari que la valoració de la mida d' un infart.

En el nostre model, la Simvastatina (l' estatina que millors resultats aportava al metanàlisi realitzat), mostrà un efecte beneficiós si s'administrava just després de la isquèmia cerebral induïda mitjançant un model MCAOe. Es va decidir utilitzar aquest model perquè era el que més s' assemblava a la patologia humana (oclusió de la MCA mitjançant un coàgul sanguini) i s'acordà una dosi de 20 mg/Kg de Simvastatina perquè estava dins el rang que més benefici havia demostrat. Amb tot això, es veié que els animals que havien rebut Simvastatina mostraven una disminució del volum d'infart d' un 43% i una milloria del dèficit neurològic d' un 35% respecte dels que havien rebut vehicle. En comparar els resultats obtinguts al nostre laboratori amb els resultats anteriorment publicats que també administraven la Simvastatina com a post tractament (Chen et al; 2003, Negaraja et al; 2008, Guluma et al; 2010), es va poder comprovar que hi havia una clara concordança.

El segon subprojecte d'aquest treball va consistir en estudiar la seguretat de la Simvastatina quan s' administrava durant la fase aguda de la isquèmia. Per una banda, es volia comprovar l'efecte que tindria la Simvastatina administrada juntament amb l' rt-PA sobre la incidència de transformacions hemorràgiques i per l' altra, l' efecte que podria causar en l' aparició d' infeccions respiratòries després de l' episodi isquèmic.

Per a dur a terme l' estudi de la incidència d' hemorràgies es va creure necessari l' ús de rates hipertenses. Les rates hipertenses pateixen alteracions vasculars (hipertròfia i pitjor funcionament vascular) que fan que presentin infarts més grans, més edema vasogènic, més alteracions de la BHE i consegüentment més TH que les soques normotenses (Henning et al; 2008).

La posada a punt del model amb rates SHR va ser molt costosa ja que en utilitzar els mateixos paràmetres usats en la primera part del projecte amb rates normotenses (2 coàguls d' 1.5 cm), la mortalitat era molt elevada (>55%) i per tant el model no era viable. En un primer moment es comprovà que no hi havia diferències entre l' ús de diferents coàguls pel que fa als paràmetres fisiològics i al grau d' oclusió. Tot i que no es van trobar diferències significatives en relació al dèficit neurològic, la mortalitat i l' aparició d' hemorràgies, el grup en què s' havia usat un sol coàgul de 3 cm i sense trombina era el que presentava un millor equilibri hemorràgies- mortalitat, és a dir, que presentava un gran nombre d' hemorràgies però tenia una mortalitat més acceptable (34, 88%).

Per a establir el moment en què s'havia d' administrar l' rt-PA, es va tenir en compte el volum d'infart, la mortalitat, el dèficit neurològic i l' aparició d'hemorràgies segons si s' administrava l' rt-PA a 1,5 hores, a les 3 hores o no s' administrava rt-PA. Es va comprovar que, contràriament al que esperàvem, no hi havia diferències significatives en cap dels paràmetres, a excepció de l' aparició d' hemorràgies. Creiem que una explicació podria ser que degut a la severitat de la lesió, l' administració de l' rt-PA a 1,5 h ja no era capaç de revertir els efectes de la isquèmia. Això recolzaria els resultats d' un metanàlisi



publicat (Sena et al; 2010) on observaven que l' rt-PA (medicament amb efectes beneficiosos clarament demostrats) no aportava cap mena de benefici quan la soca utilitzada era la SHR degut a les seves peculiaritats.

Sí es va poder observar que administrant l' rt-PA a temps retardats (3h), la incidència de l' aparició d'hemorràgies era significativament superior a quan no s' administrava el trombolític i superior a quan s' administrava 1,5 h després de la isquèmia. Aquest resultat va en concordança amb altres articles publicats (Rick et al; 2002), que conclouen que l' administració tardana de l' rt-PA comporta un major dany, tant de la BHE com de la làmina basal i, en conseqüència, una important taxa de transformacions hemorràgiques.

En referència als resultats de l' estudi amb rates SHR, cal destacar les dades obtingudes en els tests neurològics. S' observà que els animals que al test realitzat als 90 minuts de la isquèmia obtenien una puntuació entre 6 i 9, morien, gairebé el 100% de les vegades, abans de les 24h. Aquestes dades s'expliquen si tenim en compte la sensibilitat de la soca escollida i la severitat de l' oclusió. No es van trobar diferències significatives entre els animals que rebien Simvastatina i els que rebien Vehicle però tampoc entre els tests realitzats als 90 minuts de l' oclusió i els realitzats al cap de 24 h. Això ens fa pensar, una altra vegada, en què la severitat de la lesió deguda a les peculiaritats d' aquesta soca no permetien que hi hagués recuperació neurològica.

Al contrari del què esperàvem, els animals tractats amb Simvastatina no van mostrar cap diferència respecte els tractats amb Vehicle, ni en el percentatge d' infart total ni en el percentatge diferenciat entre sub-cortical i cortical. No s'han pogut contrastar els resultats ja que no hi ha, fins a dia d' avui, cap treball publicat on s' estudiï l' efecte de les estatines en rates SHR. Tampoc es van observar diferències pel què fa al volum d' edema.

Referent a la mortalitat, tot i ser molt elevada i sense diferències significatives entre els 2 grups (41% pel grup de Simvastatina i 38% pel grup Vehicle), les dades concorden amb altres articles publicats on també es treballava amb rates SHR isquèmiques. Fujiwara et al (2009) trobaven una mortalitat del 43% administrant l' rt-PA 1 hora post isquèmia, mentre que Sumii et al (2002) parlaven d' un 50% quan l' administraven a les 6 hores. En el nostre estudi, vam poder comprovar que un petit número d' animals morien abans de l' administració de l' rt-PA (eren els animals que havien mostrat un percentatge d' oclusió molt elevat) però que la majoria morien després de l' administració de l' rt-PA, i mostraven importants hemorràgies. Creiem, doncs, que l'elevada mortalitat obtinguda en aquest model és deguda, en gran part, a les hemorràgies ocasionades per l' administració de l' rt-PA i a les característiques de la vasculatura d' aquesta soca.

En referència a l' estudi d' hemorràgies, es va observar que no hi havia diferències significatives entre els 2 grups de tractament pel què fa al tipus d'hemorràgia que presentaven. En ambdós grups més del 92% dels animals presentaven hemorràgies després del tractament a les 3 hores amb rt-PA. Aquest resultat va en concordança amb els treballs publicats per Brinker et al; 1999, Fujiwara et al (2009), on

obtenen un percentatge de HT del 100% en rates SHR després del tractament trombolític a les 3 i a les 6 hores respectivament.

El tipus d' hemorràgia més freqüentment observada en els 2 grups va ser la de tipus PH-1, consistent en una regió de sang homogènia que afecta a menys d' un 30% de la lesió isquèmica (61.53% dels animals tractats amb Simvastatina i 46.66% dels tractats amb Vehicle), seguida de la de tipus HI-2, que s' observen com petèquies confluents. Com la majoria d' animals presentaven hemorràgies tipus PH, es decidí calcular l' àrea d'aquestes hemorràgies mitjançant un programa informàtic (ImageJ). S' observà una clara tendència ( $P=0.09$ ) a què els animals tractats amb Simvastatina presentessin àrees hemorràgiques ( $\text{mm}^2$ ) més petites que els tractats amb Vehicle ( $8.63 \pm 5.69$  vs  $20.03 \pm 17.42$ ).

Fent les quantificacions d' hemoglobina mitjançant WB, i tal com era d' esperar, es van trobar diferències significatives entre l' hemoglobina detectada a l' hemisferi IP i la detectada a l' hemisferi CL. Per altra banda, no es van observar diferències entre els 2 grups de tractament. Amb aquest resultat podem concloure que l' administració de Simvastatina a la fase aguda de la isquèmia no incrementa la incidència de transformacions hemorràgiques, amb la qual cosa podem dir que és segura en aquest aspecte. Aquests resultats van en la mateixa direcció que altres ja publicats (Zhang et al; 2009), que demostraven que els animals que rebien estatines després de la isquèmia però abans de l' rt-PA, mostraven un menor volum d' infart però no un increment en la incidència de TH. Per altra banda, els animals que només rebien l' rt-PA de manera tardana presentaven una incidència d' hemorràgies molt superior. Aquests resultats s'expliquen tenint en compte que l' administració de la teràpia combinada (estatines + rt-PA) redueix la sobreexpressió de diferents proteïnes induïda per l' administració d' rt-PA sol (molècula d' adhesió inter-cel·lular, MMP-9) a l'hora que redueix la quantitat de plaquetes a nivell microvascular o el dipòsit de neutròfils i fibrina (Zhang et al; 2005).

En valorar la correlació entre les 3 tècniques usades per a valorar les hemorràgies cerebrals (puntuació ECASS, quantificació de l' àrea hemorràgica tipus PH i quantificació del contingut d' hemoglobina mitjançant WB) es va comprovar una perfecta correlació entre els 2 mètodes de valoració visuals (puntuació ECASS i quantificació de l'àrea PH) però no entre aquests dos i la determinació del contingut d' hemoglobina en homogenat cerebral. En tot cas, els resultats de les 3 tècniques ens van permetre afirmar que no hi havia diferències significatives entre els animals tractats amb Simvastatina i els tractats amb Vehicle i que, per tant, l' administració de Simvastatina en la fase aguda de la isquèmia cerebral no contribuïa a l' increment de la incidència de transformacions hemorràgiques.

Ja per acabar, es va realitzar un estudi preliminar per abordar el tema de les infeccions respiratòries després de la isquèmia cerebral. Aquest és un punt molt important a tenir en compte ja que la pneumònia bacteriana és la complicació més habitual i també una freqüent causa de mort entre els pacients d' ictus (Langhorne et al; 2000). La seva incidència es correlaciona amb la severitat de l' ictus i també amb un pitjor pronòstic (Prass et al; 2006). L' elevat risc d'infecció després de la isquèmia cerebral és degut a la combinació de 2 factors: la immunodeficiència produïda per l' ictus i la major probabilitat d' aspiració del pacient (somnolència, disfàgia, immobilitat...). L' estudi MISTICS, realitzat al nostre laboratori l' any 2006 mostrà que els pacients que rebien Simvastatina durant la fase aguda de l' ictus mostraven una tendència a presentar una major proporció d' infeccions ( $OR= 2.4, 1.06-5.4$ ). Calia

contrastar aquests resultats, per això es decidí abordar el tema amb un estudi experimental, on les variables eren més fàcilment controlables i es podia procedir a l' avaluació de qualsevol tipus de mostra o teixit. Per començar a treballar en el tema, es va decidir fer un recompte diferencial de leucòcits en sang 48 hores després d' haver induït la isquèmia als animals. Degut a la immunosupressió induïda per la isquèmia, esperàvem trobar un menor percentatge de limfòcits i també un major percentatge de PMN's en les mostres d' animals isquèmics. Els nostres resultats mostraven una clara diferència entre el recompte de PMN's dels animals control i els dels animals isquèmics . En contra del què esperàvem, no es van detectar diferències significatives entre els animals sham i els animals isquèmics , amb el què podem dir o bé que el nostre model animal contribueix a incrementar el percentatge de PMN's degut a la inflamació, o bé que hem de realitzar un altre tipus de prova per tal de poder diferenciar clarament els animals SHAM dels animals isquèmics. També es va detectar una tendència a l' increment del percentatge de PMN's quan els animals eren tractats amb Simvastatina, independentment de la isquèmia (caldrà estudiar-ho més detingudament). Com era d' esperar, els resultats del recompte de limfòcits van ser inversos als del recompte de PMN's. Així, es va veure que els animals control presentaven un percentatge de limfòcits dins del rang de normalitat, mentre que els sham tenien un percentatge inferior (significativament inferior en el cas dels animals Sham que van rebre Simvastatina). Els animals isquèmics, degut a la immunosupressió produïda per la pròpia isquèmia, mostraven un percentatge de limfòcits significativament inferior quan es comparava amb els animals control.

Actualment, i per continuar treballant en aquest camí, s' estan posant a punt dues tècniques que ens permetran valorar millor les infeccions induïdes per la isquèmia. Per una banda, volem valorar les possibles lesions pulmonars ocasionades després de la isquèmia. Ja hem pogut comprovar, de manera preliminar, que tant els animals control com els SHAM, mostren una histologia pulmonar considerada normal, mentre que els animals isquèmics solen mostrar, tal i com està publicat (Mtute-Bello et al; 2001), un infiltrat neutrofílic intens i un engruiximent de les parets alveolars. Per altra banda, pretenem fer cultius bacteriològics a partir d' homogenats pulmonars per tal de poder detectar el creixement de colònies i assegurar així, que l' increment de neutròfils en sang és degut a un procés infecciós i no a una simple inflamació (Prass et al; 2003).

En resum, si aconseguim demostrar que l' administració de Simvastatina en la fase aguda de la isquèmia no incrementa la incidència d' infeccions a nivell respiratori, podrem assegurar que, a part d' aportar beneficis pel que fa a la disminució del volum d'infart i a la milloria del dèficit neurològic, és segura.

## 9. CONCLUSIONS

- La revisió sistemàtica i el metanàlisi dels experiments amb models animals ens ofereixen una visió més objectiva de l'evidència que l'ús d' estatines és beneficiós per al tractament de la isquèmia cerebral
- D' entre totes les estatines, la Simvastatina és la que exerceix un major benefici en el tractament de la isquèmia cerebral, així com l'administració de dosis múltiples d' estatines com a pre-tractament.
- Els resultats obtinguts al nostre laboratori mostren que la Simvastatina administrada com a post-tractament en un model embòlic d'isquèmia cerebral en rata, exerceix un efecte neuroprotector, acord amb la bibliografia prèviament publicada on s'usaven altres models.
- L' administració de Simvastatina (prèvia al tPA) després d' induir una isquèmia amb un model MCAOe en rates hipertenses (SHR) no comporta cap benefici pel que fa al volum d'infart ni al dèficit neurològic. Per altra banda, tampoc incrementa la incidència de transformacions hemorràgiques post administració d' rt-PA, amb el que podem concloure que és segura quan s'administra durant la fase aguda de la isquèmia cerebral i en combinació amb el trombolític (rt-PA).
- L' administració de Simvastatina 15 minuts després de la isquèmia cerebral no altera el % de PMN's en sang mesurat 48 hores després de l' episodi isquèmic però calen més estudis per comprovar l' efecte que pot tenir l'administració de Simvastatina durant la fase aguda sobre l' aparició d'infeccions respiratòries secundàries a la isquèmia.

## 10. REFERÈNCIES

### A

Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y, Shiomi M, Schoen FJ, Libby P (2001) An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation*. Jan 16;103(2):276-83.

Alvarez-Sabín J, Huertas R, Quintana M, Rubiera M, Delgado P, Ribó M, Molina CA, Montaner J. (2007) Prior statin use may be associated with improved stroke outcome after tissue plasminogen activator. *Stroke*. Mar;38(3):1076-8.

Aoki T, Sumii T, Mori T, Wang X, Lo E (2002) Blood-Brain barrier disruption and matrix metalloproteinase-9 expression during reperfusion injury. Mechanical versus embolic focal ischemia in SHR. *Stroke* 33: 2711-2717

Asahi M, Huang Z, Thomas S, Yoshimura S, Sumii T, Mori T, Qiu J, Amin-Hanjani S, Huang P, Liao J, Lo E, Moskowitz MA (2005) Protective effects of statins involving both eNOS and tPA in focal cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow & Metabolism*: 25: 722-729

### B

Badyal DK, Lata H, Dadhich AP (2003) Animal models of hypertension and effect drugs. *Indian Journal of pharmacology* 35: 349-362

Benveniste H, Kim K, Hedlund L, Kim J, Friedman A (2000) Cerebral hemorrhage and edema following brain biopsy in rats: significance of mean arterial blood pressure. *J. Neurosurgery* 92:100-107

Buck B, Liebeskind S, Saver J, Yun S, Starkman S, Ali L, Villablanca JP, Salamon N, Razinia T, Ovbiagele B (2008) Early neutrophilia is associated with volume of ischemic tissue in acute stroke. *Stroke* 39: 355-360

### C

Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang Y, Wang L, Jiang H, Zhang C, Lu M, Katakowski M, Feldkamp CS, Chopp M. (2003) Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke *Ann Neurol* 53(6):743-51.

## D

Dijkhuizen R, Asahi M, Wu O, Rosen B, Lo E (2002) Rapid breakdown of microvascular barriers and subsequent hemorrhagic transformation after delayed recombinant tissue plasminogen activator treatment in a rat embolic stroke model. *Stroke* 33: 2100-2104

Dos Santos S, Leonarde M, Silva F, Lanzetti M, Leichsenring F, Cristóbal L (2007) Effects of hyperoxia on Wistar rat lungs. *J Bras Pneumology* 33 (6): 655-662

## E

Endo A, Kuroda M, Tsujita Y (1976) ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum* *J Antibiot* 29(12):1346-8.

Essig M, Nguyen G, Prié D, Escoubet B, Sraer JD, Friedlander G (1998) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. Role of geranylgeranylation and Rho proteins. *Circ Res.* Oct 5;83(7):683-90

## G

Gautier S, Petrault O, Gele P, Laprais M, Bastide M, Bauters A, Deplanque D, Jude B, Caron J, Bordet R (2003) Involvement of thrombolysis in recombinant tissue plasminogen activator- induced cerebral hemorrhages and effect on infarct volume and postischemic endothelial function. *Stroke* 34: 2975-2979

Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1;343(6257):425-30.

Guluma KZ, Lapchak PA (2010) Comparison of the post-embolization effects of tissue-plasminogen activator and simvastatin on neurological outcome in a clinically relevant rat model of acute ischemic stroke. *Brain Res* 1;1354:206-16

## H

Hale LP, Craver KT, Berrier AM, Sheffield MV, Case LD, Owen J. (1998) Combination of fosinopril and pravastatin decreases platelet response to thrombin receptor agonist in monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* Oct;18(10):1643-6

Hazem E, Kozak A, El-Remessy AB, Frye RF, Johnson MH, Ergul A, Fagan SC (2009) Early atorvastatin reduces hemorrhage after acute cerebral ischemia in diabetic rats. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 330 (2): 532-540

Henning E, Latour L, Hallenbeck J, Warach S (2008) Reperfusion-associated hemorrhagic transformation in SHR rats. Evidence of symptomatic parenchymal hematoma. *Stroke* 39: 3405-3410

Henninger N, Bouley J, Bratane B, Bastan B, Shea M, Fisher M (2009) Laser Doppler flowmetry predicts occlusion but not tPA-mediated reperfusion success after rat embolic stroke. *Experimental neurology* 215 : 290-297

Hernández-Perera O, Pérez-Sala D, Navarro-Antolín J, Sánchez-Pascuala R, Hernández G, Díaz C, Lamas S (1998) Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. Jun 15;101(12):2711-9.

Huhle G, Abletshauser C, Mayer N, Weidinger G, Harenberg J, Heene (1999) DL. Reduction of platelet activity markers in type II hypercholesterolemic patients by a HMG-CoA-reductase inhibitor. *Thromb Res*. Sep 1;95(5):229-34.

## K

Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. (2000) The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nature Med*. Sep;6(9):1004-10.

## L

Langhorne P, Stott DJ, Robertson L, et al. (2000) Medical complications after stroke: a multi central study. *Stroke* 31:1223-9.

Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK (1998). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* Mar 31;97(12):1129-35.

Lapchak, Paul A.; Han, Moon Ku (2009) The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor simvastatin reduces thrombolytic-induced intracerebral hemorrhage in embolized rabbits. *Brain Research* Vol 1303, Nov 25 144-150

Lefer D (2002) Statins as potent Antiinflammatori drugs. *Circulation*. 106:2041-2042

Liesz A, Hagmann S, Zschoche C, Adamek J, Zhou W, Sun L, Hug A, Zorn M, Dalpke A, Nawroth P, Veltkamp R (2009) *Stroke* 40: 2849-2858

## M

Marí Fàbregas J, Gomis M, Arboix A et al (2004) Favorable outcome of ischemic strokein patients pretreated with statins. *Stroke* 35(5), 1117-1121

## N

Nagaraja T, Knight R, Croxen R, Konda K, Fenstermacher J (2006) Acute neurovascular unit protection by simvastatin in transient cerebral ischemia. *Neurological research* 28: 826-830

Nassief A, Marsh JD (2008) Statin therapy for stroke prevention. *Stroke* 39 (3), 1042-1048.

## P

Paciaroni M, Hennerici M, Agnelli g et al. (2007) Statins and stroke prevention *Cerebrovascular Diseases*.24 (2-3),170-182

Popp A, Jaenisch N, Witte O, Frahm C (2009) Identification of Ischemic Regions in a Rat Model of Stroke. *Plos one* 4:3: e4764

Prass K, Braun JS, Dirnagl U, Meisel C, Meisel A (2006) Stroke propagates bacterial aspiration to pneumonia ina a model of cerebral ischemia. *Stroke* 37: 2607-2612

## R

Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, Gotto AM Jr; Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study Investigators.(2001) Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med*. Jun 28;344(26):1959-65.



Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasuhara M, Nishi H, Inoue N, Yokoyama M. (2001) Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*. Jan;154(1):87-96.

Rodwell VW, Nordstrom JL, Mitschelen JJ (1976). Regulation of HMG-CoA reductase. *Adv. Lipids Res.* 14:1-74

Rosch J, Boyd A, Hinojosa E, Pestina T, Hu Y, Persons D, Orihuela C, Tuomanen E ((2010) Statins protect against fulminant pneumococcal infection and cytolysin toxicity in a mouse model of sickle cell disease. *The journal of clinical investigation* 120(2): 627-635

## S

Salat D, Ribosa R, García-Bonilla L, Montaner J (2009) Statin use before and after acute ischemic stroke onset improves neurological outcome. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther* 7(10):1219-1230

Sena E, Briscoe C, Howells D, Donnan G, Sandercock P, Macleod M (2010) Factors affecting the apparent efficacy and safety of tissue plasminogen activator in thrombotic occlusion models of stroke: systematic review and meta-analysis. *Journal of cerebral blood flow & Metabolism*: 1-9

Shabanzadeh AP, Shuaib A, Wang CX (2005) Simvastatin reduced ischemic brain injury and perfusion deficits in an embolic model of stroke. *Brain research* 1042: 1-5

Sierra S, Ramos MC, Esteo C, Vázquez Ja, Burgos JS (2011) Statins as neuroprotectants: a comparative in vitro study of lipophilicity, blood-brain-barrier penetration, lowering of brain cholesterol, and decrease of neuron cell death. *JAlzheimers Dis.* 23(2):307-18

Sumii T, Lo E (2002) Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 33: 831-836

## T

Tejima E, Katayama Y, Suzuki Y, Kano T, Lo E (2001) Hemorrhagic transformation after fibrinolysis with tissue plasminogen activator. Evaluation of role of hypertension with rat thromboembolic stroke model. *Stroke* 32:1336-1340

## V

Vaughan, Carl J.; Gotto, Jr., Antonio M. (2004) Update on Statins. *Circulation, Journal of the American heart association* June 110 (7): 886–892

## Y

Yoshihiro M, Rosell A, Scannevin R, Rhodes K, Wang X, Lo E (2008) Extension of the Thrombolytic time window with Minocycline in experimental stroke. *Stroke* 39 (12):3372-7

## Z

Zama Z, Lapchak P (2010) Comparision of the post embolization effects of tissue- plsminogen activator and simvastatin on neurological outcome in a clinically relevant rat model of acute ischemic stroke. *Brain research*, 07.050

Zhang L, Zhang Z, Ding G, Liu X, Meng H, Hozeska A, Zhang C, Li L, Morris D, Zhang R, Lu M, Chopp (2005) M, Multitargeted Effects of Statin-Enhanced Thrombolytic Therapy for Stroke With Recombinant Human Tissue-Type Plasminogen Activator in the Rat *Circulation*; 112: 3486-3494